

A KUTATÁSI TÉMA BESZÁMOLÓJA

A téma címe: A hősokk-proteinek és genetikai faktorok szerepe a renális iszkémia/reperfúziós károsodás okozta akut veseelégtelenség patomechanizmusában.

A kutatás időtartama: 2004-2008 (F48842)

1. Bevezetés, kutatási előzmények, a munkatervben vállalt célkitűzések

Kísérleteink célja az iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodás okozta akut veseelégtelenségben észlelt nemi különbségek és genetikai faktorok pathomechanizmusának vizsgálata volt, különös tekintettel a hősokk proteinek (HSP)k szerepére.

Klinikai méréseink során a HSP72 fehérje termeléséért felelős, *HSPA1B* gén polimorfizmus vizsgálatát végeztük el krónikus veseelégtelenségben szenvedő, illetve vesetranszplantáción átesett gyermek és felnőtt populációban.

Az átültetett szervek hosszútávú túléléséről, az I/R károsodás jelentőségéről az ismereteink az utóbbi években bővültek, de a multifaktoriális folyamat pontos etiológiája mindmáig nem ismert. Ezzel párhuzamosan természetesen a hatásos kezelés sem megoldott. Munkacsoportunk korábbiakban igazolta, hogy a nőstény állatok túlélése és posztisztkémiás veseműködése jobb, a vese strukturális károsodása enyhébb, mint a hímeké [1,2,3,4]. Kimutattuk továbbá, hogy nőstényekben a Na/K ATPáz (NKA) a károsodást követően is fiziológias, bazálmembránhoz kötött helyén marad és az enzimfunkció megtartott. Ezzel szemben hímekben a NKA időfüggően kihelyeződik a citoszólba és az apikális membránra, mely az enzim inaktivációjához vezet [5].

Mivel az I/R károsodás patomechanizmusa rendkívül összetett, így számos más faktor és mechanizmus, köztük a membrán dezintegráció, protein degradáció, stb. változását is figyelembe kell venni a NKA iszkémiás változásainak értékelése során, melyek további tanulmányozása képezte jelen OTKA pályázatunk fő részét.

2. EXPERIMENTÁLIS VIZSGÁLATOK: A nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a NKA és a HSP72 expressziójára renális I/R károsodást követően

2.1. Előzmények

Az I/R károsodás során a felszabaduló reaktív oxigénradikálok hatására a legtöbb membrán- és transzportfehérje denaturálódik. A tönkrement fehérjék aggregátumokat képeznek, eliminálásuk nehéz. A sejtmembrán károsodása miatt a membrán-kapcsolt transzportfolyamatok, így a NKA működése is zavart szenved. Az iszkémiás inzultust követően, a károsodott proteinek struktúrájának helyreállítása, illetve eliminálása tehát kulcsfontosságú a szövetek túlélése szempontjából. Ezekben a helyreállító folyamatokban a HSPk központi szerepet töltenek be [6].

A HSP70 család tagjai élettani körülmények között szerepet játszanak a frissen szintetizálódott fehérjék térszerkezetének kialakításában, a részlegesen károsodott vagy hibás fehérjék átalakításában és a denaturálódott proteinek degradációjában [7]. A citoszólban és a sejtmagban kimutatható egy állandóan jelenlevő konstitutív forma a HSP73 és egy stressz-indukált (hőmérsékletemelkedés, hipoxia, hiperoxia, gyulladás, toxikus károsodás) forma a HSP72 [8].

Humán és állatkísérletes vizsgálatok egyaránt igazolták a HSP72 jelentőségét a vese I/R károsodásában. Vicencio és mtsai bizonyították, hogy a HSP72 expressziója renális iszkémiát

követően fokozódik, továbbá, hogy az elégtelen HSP72 szintézis az iszkémiás tolerancia csökkenéséhez és a vesefunkciók romlásához vezet [9]. A renális iszkémia hatására indukált és expresszált HSP72 fehérjék segítik a citoszkeleton struktúrájának reintegrációját és a tubuláris epithel polaritásának megőrzését. Immunhisztokémiai vizsgálatok során igazolták, hogy az expresszált HSP72 lokalizációja megegyezik az iszkémia hatására eredeti helyéről a citoszólba került NKA elhelyezkedésével [10].

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

2.2. Kérdésfeltevés- A kutatás célja

- A. Hogyan változik a HSP72 expressziója nőstény és hím állatokban renális I/R károsodást követően?**
- B. Befolyásolja-e a HSP72 változása a NKA működését és lokalizációját renális I/R károsodást követően? Észlelhető-e nemi különbség?**
- C. A nemi hormonok befolyásolása (gonadektómia, illetve dehidroepiandoszteronnal (DHEA) történő előkezelés) hogyan hat a fenti folyamatokra?**

2.3. Módszerek

2.3.1. Kísérleti állatok, vizsgálati csoportok

Kísérleteinket ivarérett nőstény (N) (240 ± 30 g), és hím (H) (300 ± 35 g) Wistar patkányokon végeztük. A nemi hormonok vizsgálatára gonadektomizált és DHEA kezelt (4/mg/tskg/nap, ip., 1 nappal az I/R előtt és utána 7 napig) állatokat használtunk. Kontrollként minden kísérletben uninefektomizált, áloperált, nem-iszkemizált nőstény és hím állatok szolgáltak (túlélés-vizsgálatok: N=12/csoport, egyéb mérések: N=8/csoport)

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

2.3.2. I/R műtéti beavatkozás és túlélés

Hőmérséklet szabályozott operációs padon ip. nátrium-pentobarbitál (50 mg/ttkg, Nembutal, Abbott Laboratories,) anesztéziában, medián laparotomiából a bal vesét ellátó artériát és vénát 55 percre klippel leztorítottuk (Biemeier, Aesculap). Az iszkémiás periódus alatt a hasfalat ideiglenesen zártuk. Az iszkémiás idő lejárta előtt, az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. A klip felengedése után a műtéti nyílást véglegesen zártuk. Az állatok túlélését 7 napig követtük.

2.3.3. Funkcionális, szövettani és molekuláris biológiai vizsgálatok

A veseszövet funkcionális, szövettani és molekulárbiológiai analíziséhez kísérleteinket megismételtük nőstény és hím ivarérett, gonadektomizált Wistar patkányok csoportjaival. A fenti műtéti beavatkozást követően, az egyes posztisztkémiás időpontokban (2 óra, 16 óra, 24 óra) az állatokat újra elaltattuk, vizelet és vérmintát vettünk, majd kivéztettük. Az izolált szérumot és az eltávolított vesék egy részét -80 °C-on tároltuk. A hisztológiai vizsgálatokhoz

a vesék tárolására 4% pufferolt formalint (pH=7,4), fluoreszcens immunhisztokémiához 30%-os szukrózoldatot használtunk.

2.3.3.1. Funkcionális mérések

A plazma illetve a vizelet urea nitrogén (BUN), kreatinin, nátrium (Na) és kálium (K) koncentrációt fotometriás úton hagyományos teszt kittel, az állatok nemi hormon szintjét szérumból ELISA kittel (Stressgen) mértük.

2.3.3.2. Hisztológia és immunhisztológiai analízis

Az eltávolított vesék egy részét paraffinba ágyazást követően hematoxin/eozinnal illetve perjódsav-Schiff reagenssel festettük meg. Fénymikroszkóppal értékeltük a tubuláris (nekrózis, lumenváltozás, feloldódás, magatípiá, vakuolizáció), glomeruláris (szklerózis, ödéma) és az intersticiális (ödéma, infiltráció) károsodás mértékét.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz szukrózban tárolt, majd fagyasztva metszett veséken primer anti-egér, monoklonális NKA (1:200, Upstate Biotechnology) és anti-nyúl poliklonális HSP72 (1:1000, Dr. László Lajos, ELTE, Állatszervezettani tanszék) antitesteket alkalmaztunk. Másodlagos antitestként torna-peroxidázzal konjugált, fluoreszcens anti-egér Alexa 488 (1:2000, illetve anti-nyúl Alexa 546 (1:2000, Invitrogen) anti-IgG ellenanyagot, magfestésre Hoechst 33342 (1:3000, Sigma) használtunk. Az eredményeket konfokális lézermikroszkóppal értékeltük ki (Zeiss Axiovert, LSM 640), mely lehetővé teszi az egyes sejtkompartmentek külön-külön történő vizsgálatát, illetve a kolokalizáció megítélését.

2.3.3.3. RT-PCR

A veseszövetet guanidin-isotiocianát lízispufferben homogenizáltuk, az RNS-t RNeasy™ Mini Kittel (Qiagen) izoláltuk. Minden mintából 1 µg totál RNS-t konvertáltunk cDNS-é 20 µl végtérfogatban, 200 U SuperScript II™ RNase H⁻ reverz transzkriptáz, 20 U RNaseOUT™ inhibitor és 3,75 pg/µl oligo dT₁₂₋₁₈ primer hozzáadásával (Gibco/BRL). A reverz transzkripciót 20°C, 10 min, 42°C, 45 min, 99°C, 5 min. végeztük.

A szemikvantitatív PCR reakciókat 50 µl végtérfogatú [10% 10x PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM primer, 1,5 U rekombináns Taq polimeráz (Qiagen), reakcióelegyben végeztük (PE, Model 2400), 2 µl cDNS felhasználásával.

A PCR reakciókat a primerekre jellemző annealing hőmérsékletek kivételével, azonos módon vittük véghez. A kezdeti 5 perces 94 °C-on végzett denaturációt követően, a templátot 35 cikluson [94 °C, 15 sec (denaturáció), 58 °C (NKA α1, β1), 66°C (HSP72), 55 °C (GAPDH) 30 sec (annealing), 72 °C 30 sec (extenzió)] keresztül amplifikáltuk, végül egy 7 percgig tartó 72 °C-on történő inkubációval fejeztük be a PCR reakciót. A keletkezett terméket ethidium-bromiddal festett 2,5%-os agaróz gélen szeparálva tettük láthatóvá (Invitrogen). A PCR reakciók eredményeit Gel-Pro™ szoftverrel denzitometráltuk és értékeltük. A patkány specifikus primerek adatait az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

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

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

2.3.3.3. Western blot

100 mg veseszövetet hűtött lizáló pufferben [10 mM TRIS-HCl (1 M) pH=8,0, 60 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,75 mg/l leupeptin, 1 mM/l EDTA, 1 mM/l EGTA (0,5 M), 0,5 mM PMSF, 0,1 mM dithiotreitol] (Sigma) homogenizáltunk. A magfrakciót centrifugáltuk (680 g, 5 min, 4°C), az így nyert felülúszót (TOT) - 80°C-on tároltuk.

Kísérletes körülmények között a NKA iszkémia hatására bekövetkező kihelyeződése a Triton X-100 extraktibilitással jellemezhető. A detergens hozzáadását követően egyszerű centrifugálással elválasztható a Triton-inszolubilis citoszkeletális frakció, a sejt Triton-szolubilis egyéb elemeitől. Ez a módszer elfogadott eszköz a posztiszkémiás redisztribúció megítéléséhez [4]. A citoszkeletális (pellet-PEL) és a non-citoszkeletális (szupernatáns-SUP) frakciók elkülönítésére a feljebb leírt extrakciós pufferhez 0,1% Triton X-100-at adtunk. 100 mg veseszövetet homogenizáltunk, majd 35 000g centrifugáltuk 15 min, 4°C-on. A keletkezett Triton-inszolubilis PEL frakciót az extrakciós pufferben reszuszpendáltuk, a Triton-szolubilis SUP frakcióval együtt -80°C-on tároltuk, a fehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford szerint határoztuk meg.

A mintákból 15µg összfehérje-mennyiséget 12,5 % SDS-poliakrilamid gélen elektroforetizáltunk (2 h, 120V, 20 mA) hűtött rendszerben, majd nitrocellulóz membránra (Hybond™ ECL™, AP Biotech,) elektroblottoltuk (70 V, 220 mA, 80 perc), TRIS-HCl, glicin és metanol tartalmú standard transzfer pufferben. A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau S (Sigma), 25 % ecetsav festékkeverékkel ellenőriztük. A blottmembránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10% PBS puffer) inkubáltuk.

Az immunoblottoláshoz szükséges ellenanyag koncentrációkat előzetesen dot-blot technikával határoztuk meg. A membránokat az immunhisztológiai módszereknél ismertetett antitestekkel (NAK α 1 1:750, NAK β 1 1:2000, HSP72 1:10000 hígításban) 1 óráig inkubáltuk. Majd 3x10min mosás után a második, torna-peroxidázzal jelölt ellenanyaggal (1:2000 anti-rabbit IgG illetve 1:5000 anti-mouse IgG hígításban) a membránokat 30 percig inkubáltuk, és újra mostuk (3x20min).

Az immunoreaktív helyek kemolumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel (AP Biotech,) detektáltuk, majd Gel-Pro™ szoftverrel denzitometráltuk.

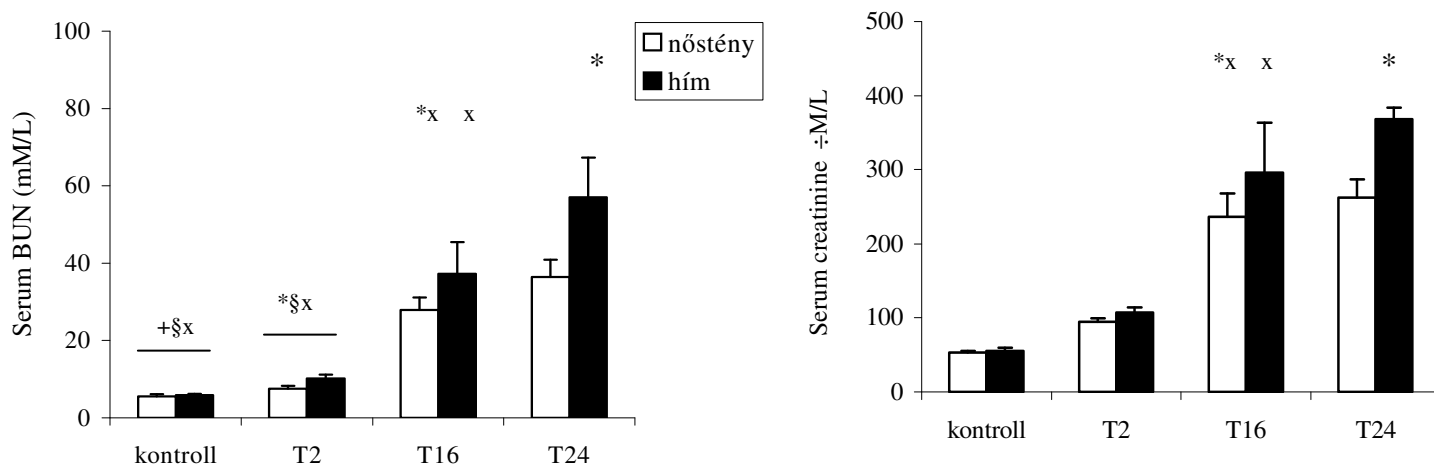
2.3.3.3. Statisztikai analízis

Az adatokat átlagérték \pm SD (standard szórás) értéként adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0.05$ értéket tekintettük. A statisztikai elemzést a STATISTICA.6 szoftverrel (StatSoft® Inc., USA) végeztük. Az állatok túlélésének jellemzéséhez Kaplan-Mayer analízist (Log-rank test), a hisztológiai vizsgálatokhoz Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. A csoportok összehasonlítására kétmintás t-próbát vagy ANOVA tesztet használtunk Newman-Keul post-hoc teszttel kiegészítve.

2.4. Eredmények

2.4.1. Nemi különbségek a posztisztkémiai károsodásban és a HSP72 expressziójában

2.4.1.1. A vesefunkciós értékek változása



1. ábra A BUN és a szérum kreatinin változásai renális I/R károsodást követően.

* $P < 0.05$ versus M; + $P < 0.05$ versus T2, § $P < 0.05$ versus T16; $x P < 0.05$ versus T24

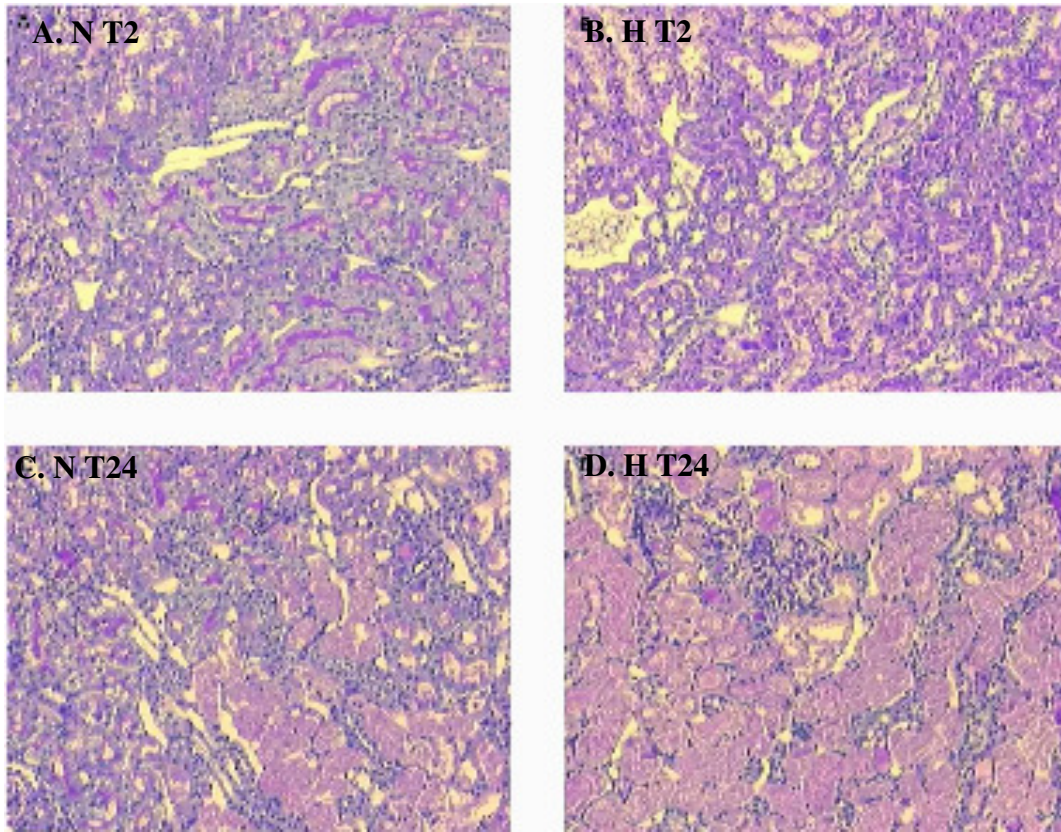
Nemi különbség mutatható ki a BUN és a kreatinin értékeiben T2, T16 és T24 időpontban ($P < 0.05$ H vs. N). Mindkét paraméter folyamatosan emelkedett a reperfúzió folyamata során, mely az akut veseelégtelenség kialakulását jelzi ($P < 0.05$).

2.4.1.2. A veseszövet strukturális károsodása

A renális erek leztorítása mindkét nemből a veseszövet jelentős károsodását eredményezte, melyet a hisztológiai paraméterek (tubuláris nekrózis, tubulussejt feloldódás, perivaszkuláris leukocita infiltráció) változása is tükröz (kontroll vs. T2, és T2 vs. T16; $P < 0.05$). Glomeruláris károsodást, intersticiális ödémát, illetve intersticiális limfocita infiltrációt egyik csoportban sem észleltünk. T2 időpontban nem volt szignifikáns nemi különbség a vizsgált hisztológiai paraméterekben. T16 és T24-ben nőstényekben a tubuláris nekrózis és a tubulussejt feloldódás mértéke kevésbé volt kifejezett, mint hímelekben, mely enyhébb károsodást jelez ($P < 0.05$).

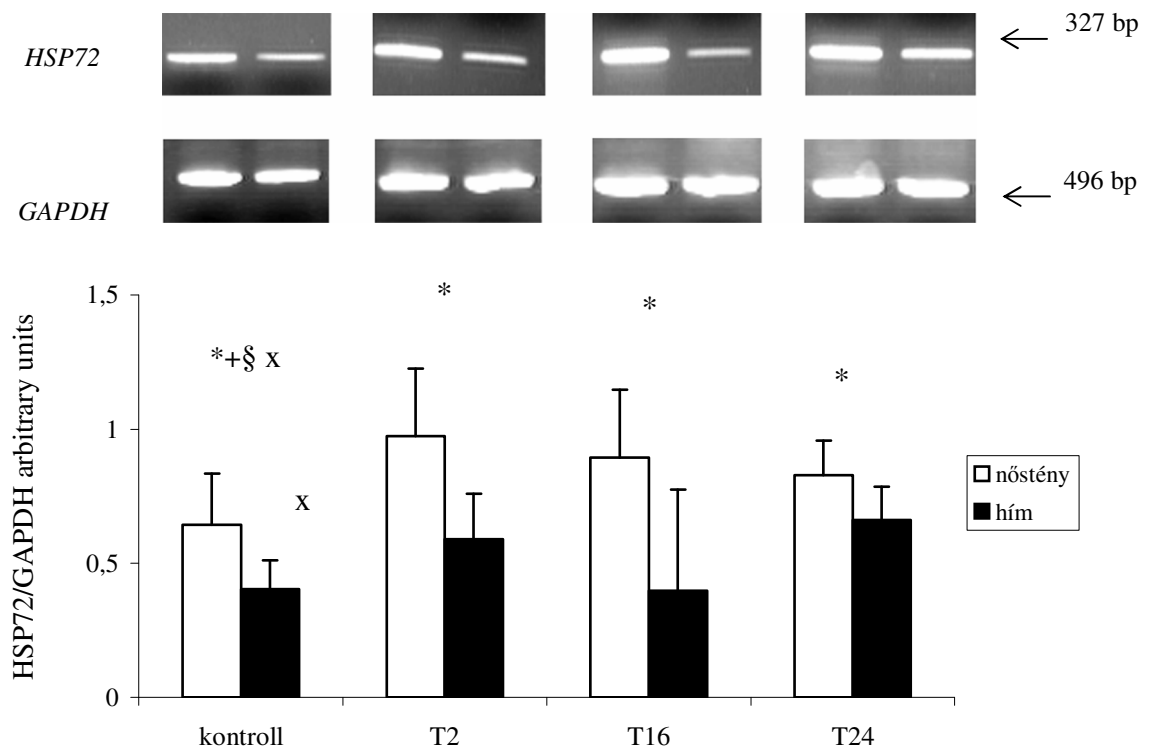
Idő (h)	Csoport	Tubuláris nekrózis	Tubuláris dissolving	Leukocita infiltráció
Kontroll	N	0.0 (0-0) +§x	0.0 (0-0) §x	0.3 (0-1) +§x
	H	0.0 (0-0) +§x	0.0 (0-0) +§x	0.3 (0-1) §x
T2	N	1.0 (1-1) §x	0.6(0-1) §x	1.2 (1-2) §x
	H	1.0 (1-2) §x	1.0 (0-1) §x	0.8 (0-1) §x
T16	N	2.7 (2-4)*	2.7 (1-4)*	1.8 (1-2)*
	H	4.0 (4-4)	4.0 (4-4)	2.4 (2-3)
T24	N	2.1 (1-3)*	2.3 (1-3)*	2.3 (1-4)*
	H	4.0 (4-4)	4.0 (4-4)	3.0 (2-4)

2. táblázat A veseszövet hisztológiai analízise renális I/R károsodást követően. * $P < 0.05$ versus H; + $P < 0.05$ versus T2, § $P < 0.05$ versus T16; $x P < 0.05$ versus T24



2. ábra Nőstény és hím állatok PAS-sal festett veséjének hisztopatológiai analízise renális I/R után 2 (A, B) és 24 órával (C, D).

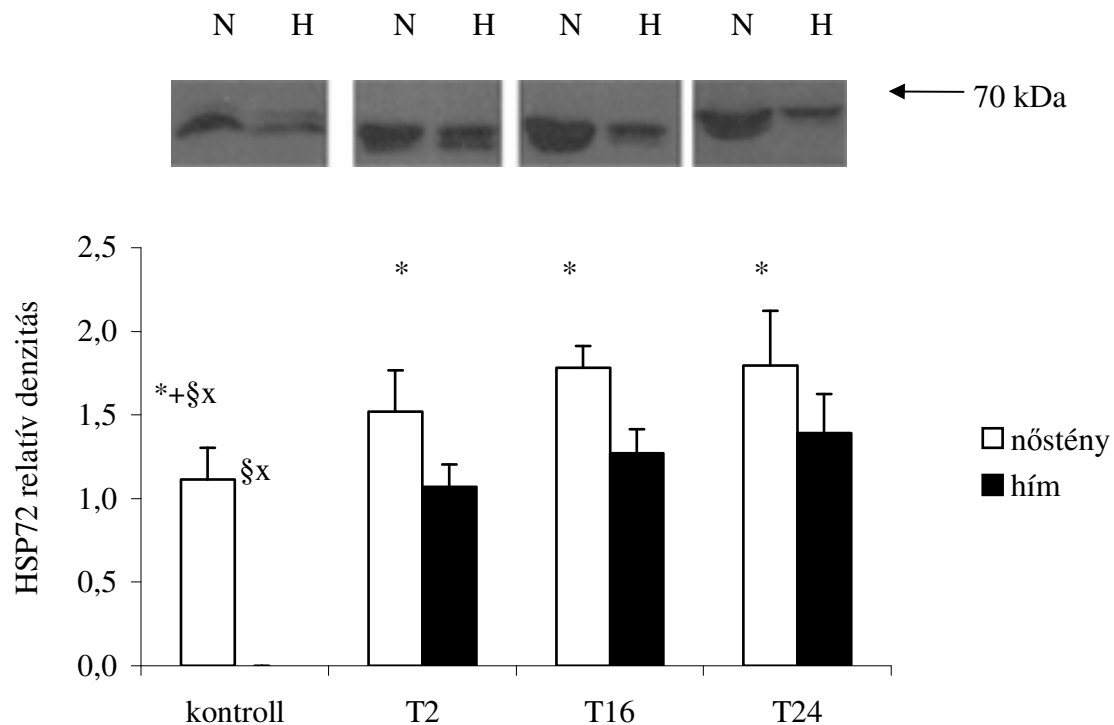
2.4.1.3. A renális I/R károsodás hatása a HSP72 mRNS expressziójára patkányvesében.



3.ábra Felső kép: A HSP72 és a GAPDH RT-PCR eredményének reprezentatív képe. **Alsó kép:** A HSP72 mRNA GAPDH mRNA-re vonatkoztatott relatív jelintenzitása. * $P < 0,05$ versus H; $^+P < 0,05$ versus T2, $^{\S}P < 0,05$ versus T16; $^xP < 0,05$ versus T24

A HSP72 mRNA expressziója nőstényekben magasabb, mint hímeekben már a kontroll csoportokban is, ez a nemi különbség a reperfüzió alatt is végig megmaradt ($P < 0,05$). Míg nőstényekben az iszkémiát követően a HSP72 mRNA expresszió azonnal és jelentősen növekedett (kontroll vs. T2: $P < 0,05$), addig hímeknél ez az expresszióváltozás kisebb mértékű és lassabb volt. Hímeekben a HSP72 mRNA szintje csak 24 órával az iszkémia után érte el a kontroll nőstényekben mért szintet.

2.4.1.4. A renális I/R károsodás hatása a HSP72 fehérjeszintjére patkányvesében.



4.ábra A renális I/R károsodás hatása HSP72 fehérje mennyiségére patkány veseszövetében. Felső kép: A HSP72 Western blot vizsgálat reprezentatív képe. **Alsó kép:** A Western blot képeket belső standardra ill. beta-aktinra vonatkoztatva értékeltük. * $P < 0,05$ versus H; $^+P < 0,05$ versus T2, $^{\S}P < 0,05$ versus T16; $^xP < 0,05$ versus T24

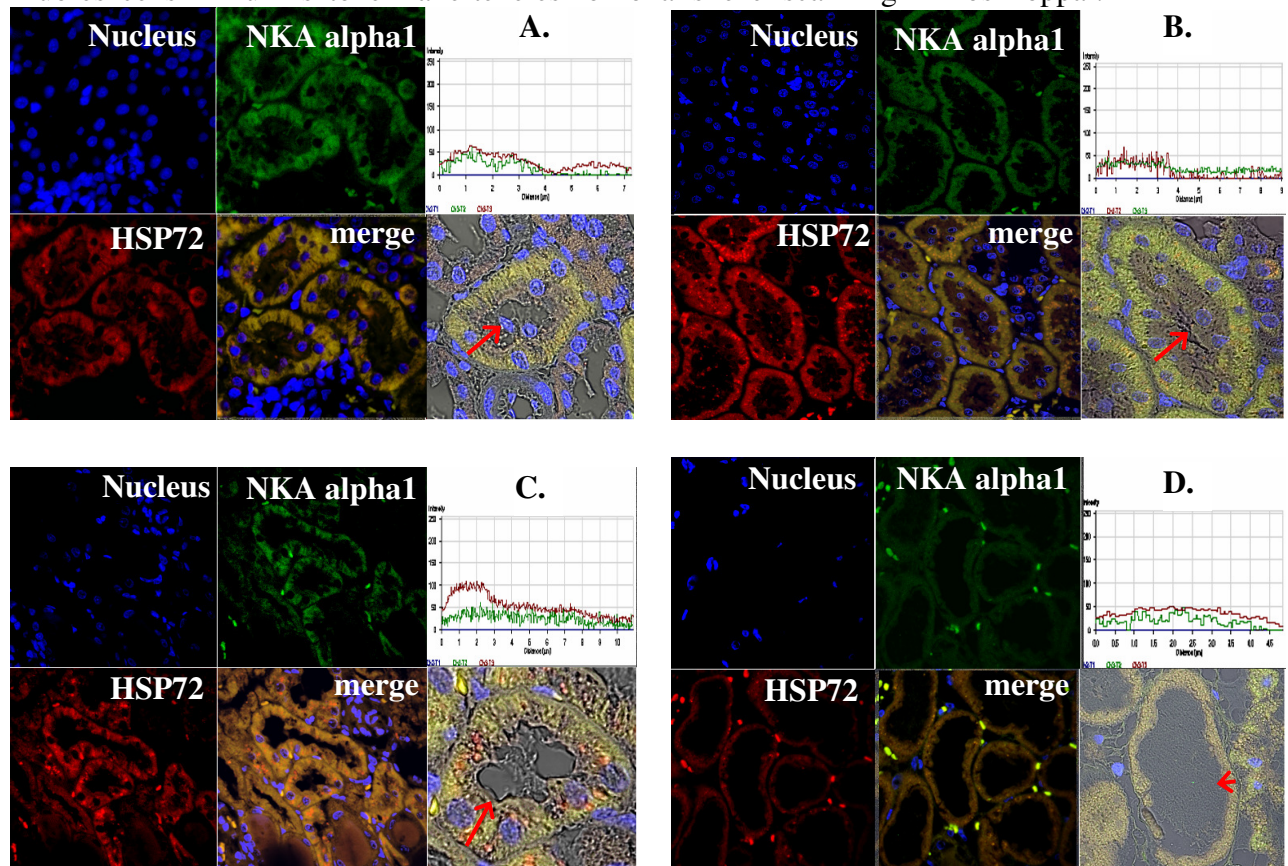
A HSP72 protein mennyisége magasabb volt nőstényekben, mint hímeekben már a kontroll állatokban és a vizsgált (T2, T16, T24) időpontok mindegyikében ($P < 0,05$ N vs. H). Az mRNA-hez hasonlóan az iszkémiás inzultust nőstényekben jelentős HSP72 szint emelkedés követte, mely már T2-ben elérte maximumát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

2.4.1.4. A HSP72 és a NKA alfa-1 alegység lokalizációja vesében renális I/R károsodás után

A kontroll nőstény és hím (4A-B.) állatok proximális tubuláris sejteiben a HSP72 és a NKA a sejtek bazolaterális membránján ko-lokalizálódott, a fehérjék csak minimális mennyiségben jelentek meg a citoszólban vagy az apikális doménen. Nemi különbség a

kontroll vesékben nem volt. Míg a nőstény állatok posztisztkémiás veséjében (4C.) mindkét fehérje továbbra is főként a bazolaterális membránra lokalizálódott, hímek esetében az apikális membránra illetve a citoszólba történő kifejezett kihelyeződést figyeltünk meg (4D.)

Fluoreszcens immunhisztokémiai értékelés konfokális lézer scanning mikroszkóppal:



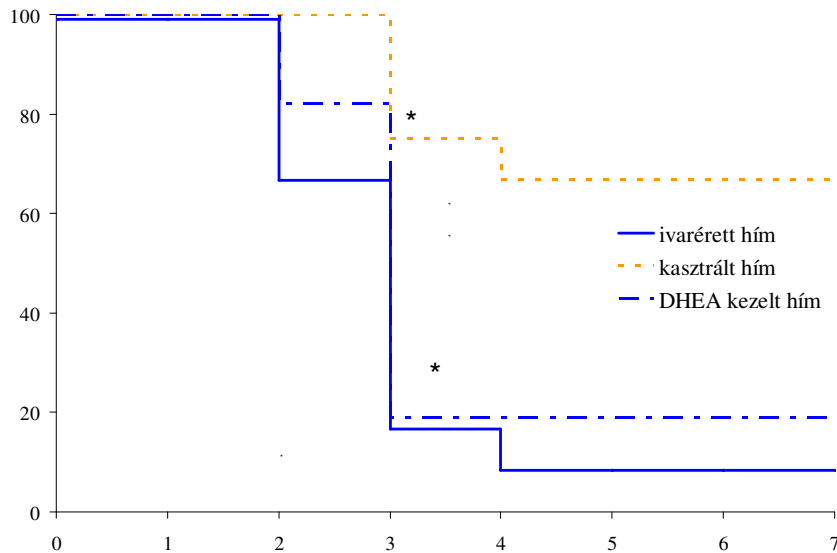
5. ábra Reprezentatív képek a HSP72 (piros) és a NKA alfa-1 (zöld) ko-lokalizációjáról (sárga) kontroll N (A) és H (B) illetve posztisztkémiás N (C), és H (D) állatok vesemintáiból. A sejtmagokat kézzel festettük. A HSP72 (piros) és NKA alfa-1 (zöld) fluoreszcens jeleinek intenzitását a nyílnak megfelelő horizontális metszetben az ábrák jobb felső sarkában lévő képek mutatják.

2.4.2. DHEA kezelés és gonadektómia hatásának vizsgálata a renális I/R érzékenységre

Ugyanebben az állatmodellben a nemi hormonok vizsgálatára a korábbi műtéti technikával I/R károsodást modelleztünk gondadektomizált (24 kasztrált hím) (G_{kaszt}) illetve DHEA-val (i.p. 4mg/kg/nap az iszkémia előtt egy nappal, majd a beavatkozást követő 7 napon át), mint ösztrogén hatású hormonnal előkezelt hím (G_{DHEA}) Wistar patkányon. Első lépésben vizsgálatuk az állatok 7-napos túlélését, második lépésben az állatokat a reperfüzió 2 (T₂) és 24 (T₂₄) órájában frakcionáltan leöltük, a mintákat a korábbi molekuláris biológiai módszerekkel értékeltük. Kontrollként áloperált, propilén-glikol vivőanyaggal kezelt hím állatok szolgáltak (G_K).

2.4.2.1. A túlélés vizsgálata

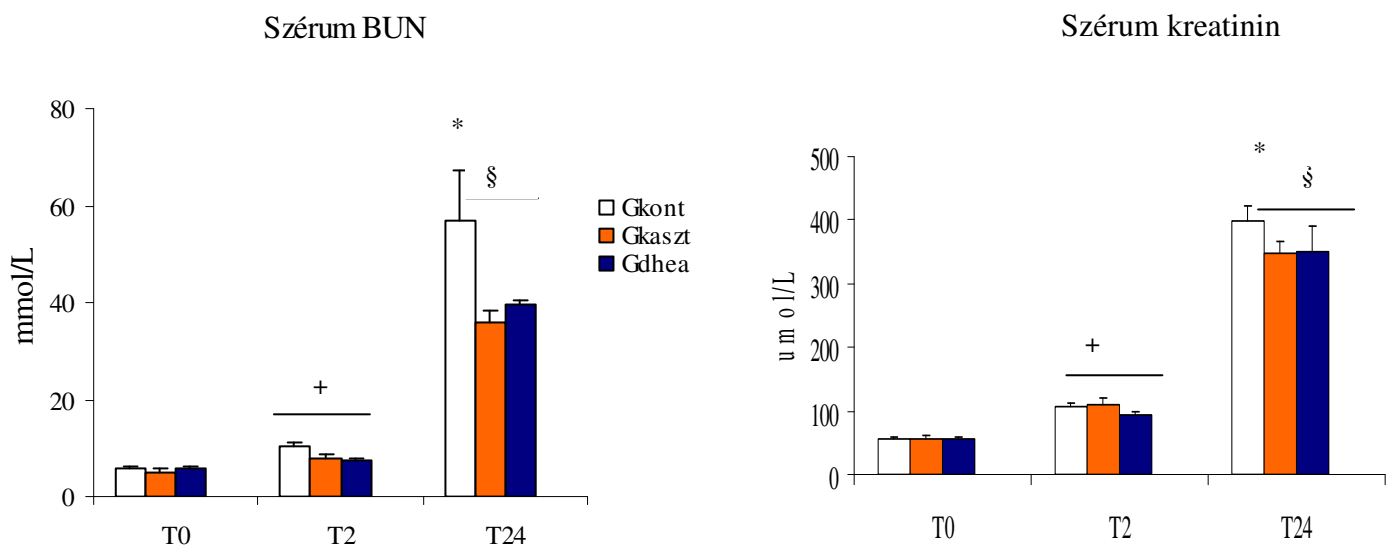
Mind a DHEA kezelés, mind a kasztráció szignifikánsan javította az állatok túlélését az ivarérett hímekekhez viszonyítva. A kasztráció hatása még protektívabbnak bizonyult mint a hormonkezelés. (6. ábra)



6. ábra 7-napos túlélés renális I/R károsodást követően ivarérett kontroll hím, kasztrált és DHEA kezelt állatokban * $P < 0,05$ versus ivarérett kontroll

2.4.2.2. A vesefunkciós értékek változása DHEA kezelést és kasztrációt követően renális I/R károsodás után

Bár a szérumbun és kreatinin értékek progresszív romlása a renális I/R károsodást követően akut veseelégtelenség kialakulására utal, a posztisztkémiai vesefunkció kevésbé romlott és a veseműködés relatíve megtartottabb volt a G_{DHEA} és G_{kaszt} csoportokban a kontroll állatokhoz képest, mind T2, mind T24 időpontban.



7. ábra A BUN és a szérumbun kreatinin változásai renális I/R károsodást követően. * $P < 0,05$ versus G_{DHEA} , G_{kaszt} ; + $P < 0,05$ versus T0; § $P < 0,05$ versus T2.

2.4.2.3. A veseszövet hisztológiai analízise DHEA kezelést és kasztrációt követően renális I/R károsodás után

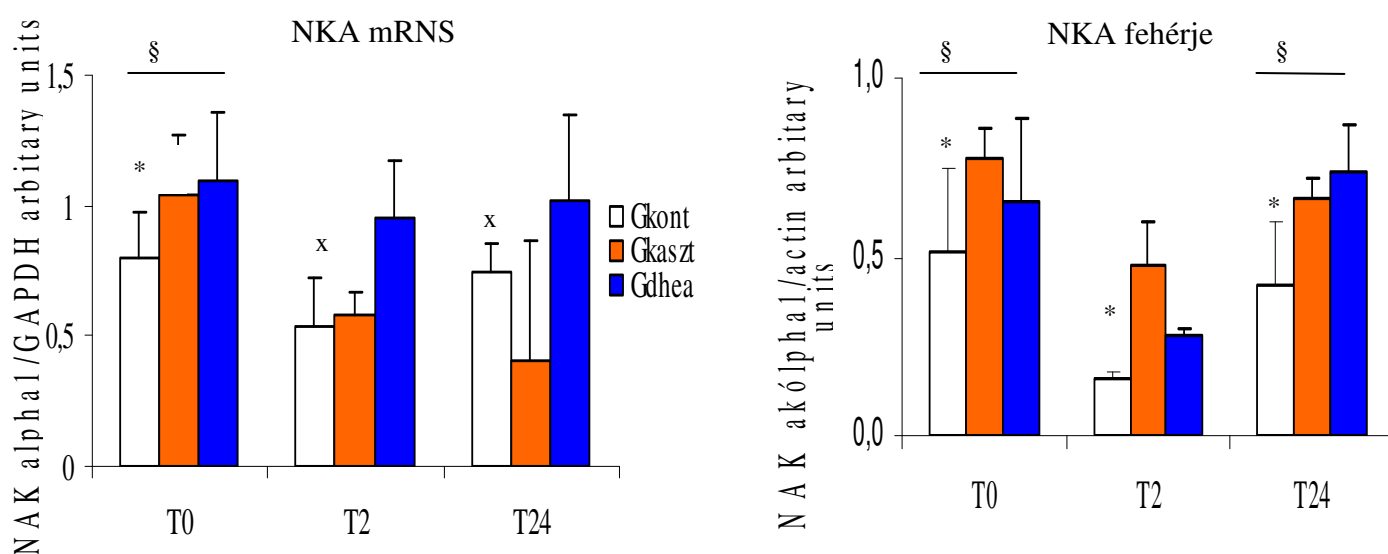
A veseszövet tubuláris, glomeruláris és intersticiális károsodása enyhébb volt a DHEA kezelt és a kasztrált állatok csoportjaiban a kontrollokhöz viszonyítva T2 és T24 időpontokban egyaránt. A vese posztisztkémiás strukturális károsodását tekintve a kasztráció és a DHEA kezelés hatása nem különbözött az egyes időpontokban.

Csoport	Glomeruláris összesítés	Tubuláris nekrozis	Tubuláris hialinizáció	Limfocita infiltráció	Intersticiális károsodás
T0 G _K	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
T0 G _{kaszt}	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
T0 G _{DHEA}	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
T2 G _K	2 (0-2)* ⁺	1 (0-2) ⁺	1 (0-1)	1 (0-1) ⁺	1 (0-2)*
T2 G _{kaszt}	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)	0.5 (0-1)	0 (0-1)
T2 G _{DHEA}	0 (0-0)	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (1-2)	0 (0-1)
T24 G _K	2 (2-2)*	3 (2-4) [§]	2 (2-2) ^{+§}	2 (1-3) ^{+§}	3 (0-3) ^{+§}
T24G _{kaszt}	0 (0-1)	3 (2-3) ^{+§}	2 (2-2) ^{+§}	1 (1-2)	1(0-1) ⁺
T24G _{DHEA}	0 (0-1)	3 (2-3) ^{+§}	2 (1-2) ^{+§}	1 (1-2)	1 (0-1) ⁺

3.táblázat A veseszövet hisztológiai analízise renális I/R károsodást követően. * $P < 0,05$ versus G_{DHEA} , G_{kaszt} ; ⁺ $P < 0,05$ versus $T0$; [§] $P < 0,05$ versus $T2$

2.4.2.4. A NKA mRNS expressziója és fehérjeszintje patkány vese kortikális homogenizátumban renális I/R károsodás után

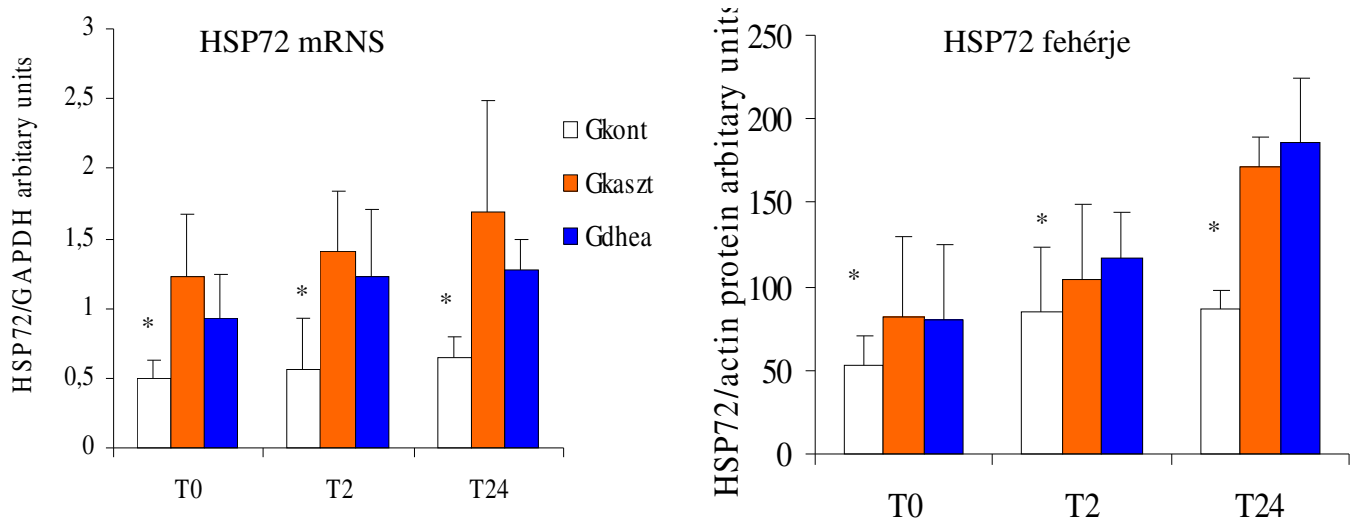
A NKA posztisztkémiás változásának dinamikája minden csoportban azonos volt, T2-ben átmeneti gyors csökkenést, T24 időpontra ismételt emelkedés követett. G_{DHEA} állatokban mind az mRNS, mind a protein szintje meghaladta a G_{kont} csoportban mért szinteket már az iszkémia előtt is, a kasztrált állatokban csak a protein szint mutatott jelentős eltérést a vizsgált időpontokban.



8. ábra. NKA mRNS expresszió és protein szint vese kortikális homogenizátumban * $P < 0,05$ versus G_{DHEA} , G_{kaszt} ; ^x $P < 0,05$ versus G_{DHEA} [§] $P < 0,05$ versus $T2$

2.4.2.5. A HSP72 mRNS expressziója és fehérjeszintje patkány vese kortikális homogenizátumban DHEA kezelést és kasztrációt követően, renális I/R károsodás után

A HSP72 mRNS és proteinszintje minden időpontban, mind G_{DHEA} , mind G_{kaszt} állapotban meghaladta a kezeletlen kontrollokét. Míg G_{kont} csoportban a HSP72 a reperfüzió időszaka alatt számottevő mértékben nem változott, addig a G_{DHEA} és G_{kaszt} csoportban progresszív emelkedést észleltünk.

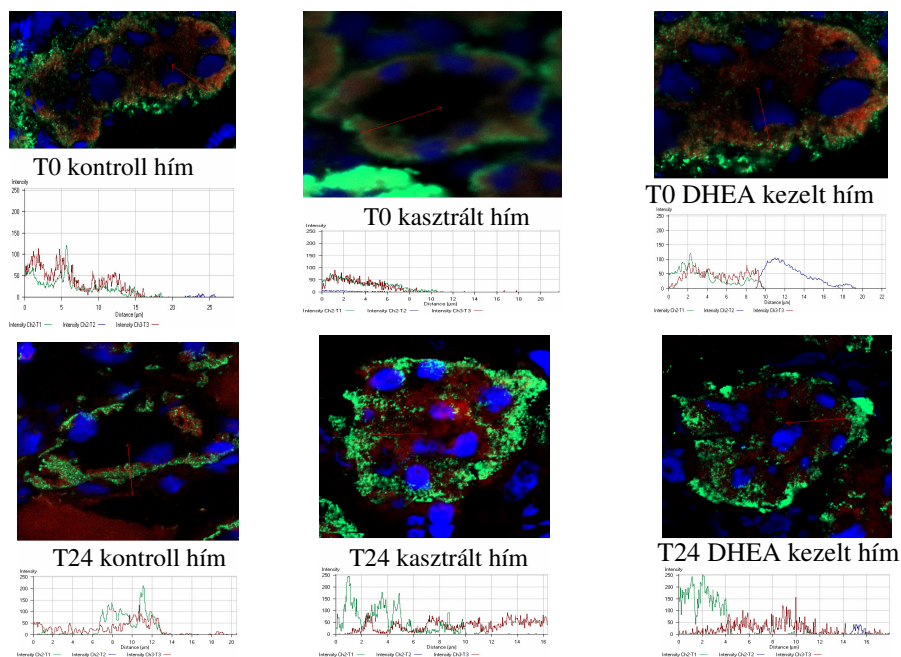


9. ábra. HSP72 mRNS expresszió és protein szint vese kortikális homogenizátumban

* $P < 0,05$ versus G_{DHEA} , G_{kaszt} ; $^x P < 0,05$ versus G_{DHEA} $^s P < 0,05$ versus T2

2.4.2.6. A NKA és a HSP72 immunhisztokémiai lokalizációja DHEA kezelést és kasztrációt követően, renális I/R károsodás után

G_{DHEA} és G_{kaszt} állapotokban a NKA posztisztkémias transzlokációja kevésbé volt kifejezett, mint a kezeletlen kontrollokban. A HSP72 ezekben a csoportokban kolokalizált festődést mutatott a NKA alfa-1 alegységgel.



10. ábra A HSP72 (piros) és a NKA alfa-1 (zöld) lokalizációja kontroll, kasztrált és DHEA kezelt T0 illetve T24 állatok vesemintáiban.

2.5. Megbeszélés-Következtetések

Az I/R károsodás során a NKA eredeti bazálmembránhoz kötött helyéről a citoszólba kerül ki, ezáltal átmenetileg gátlódik az enzim működése. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy nemi különbség van a NKA posztisztkémiás transzlokációjában, ami együtt jár az ionpumpa aktivitásának különbségeivel és így közvetve hozzájárulhat a vese nemek között eltérő posztisztkémiás regenerációjához.

Előzetes vizsgálatok alátámasztották, hogy HSP72 segít a sejtmembrán fehérjeszerkezetének megőrzése révén a NKA pumpafunkciójának fenntartásában. Kimutatták továbbá, hogy a denaturálódott proteinek nem csupán szubsztrátjai a HSPk-nek, de serkentik is a hőshock választ [10]. Mindezek alapján kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a NKA expressziójában és működésében megfigyelt nemi különbségek háttérében nem a HSP72 hímekben és nőstényekben különböző mértékű expressziója áll-e.

Elsőként igazoltuk, hogy nemi különbség van a vese posztisztkémiás HSP72 mRNS és fehérje expressziójában. Kimutattuk, hogy már intakt körülmények között is a kontroll nőstény állatok HSP72 mRNS és fehérje szintje mintegy másfélszerese a hímekének [11]. Korábbi vizsgálatok alapján ismert, hogy azok a szervek, illetve szövetek, melyek nagyobb mértékben expresszálják a HSP72-t celluláris stresszel szemben ellenállóbbak, továbbá, hogy intakt szervek/szövetek megnövekedett HSP72 expressziója fokozott stresszrezisztenciát jelez [12]. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a kontroll nőstényekben észlelt magasabb HSP72 mRNS szint az iszkémiás károsodással szembeni nagyobb toleranciára utal.

Az iszkémiás inzultus után 2 órával nőstényekben a HSP72 mRNS szintje mintegy duplájára nőtt, míg hímekben jóval kisebb mértékű expresszió növekedést észleltünk. Az expresszált HSP72 mRNS mennyiségében észlelt különbség mellett, nemi különbséget észleltünk az expresszió dinamikájában is. Míg nőstények esetében már 2 órával az iszkémiás inzultus után a kontrollokhoz képest szignifikánsan magasabb mRNS értékeket detektáltunk, hímek esetében a HSP72 mRNS szintje kevésbé emelkedett maximumát később, 16 óra elteltével érte csak el. A HSP72 protein értékek változásai jól korreláltak az mRNS szintekben észlelt eltérésekkel. A HSP72 fehérje mennyisége nőstényekben a vizsgált periódus során végig magasabb volt, mint hímekben.

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

Az iszkémia hatására a NKA a károsodott membránból a citoszólba diszlokálódik és ezáltal károsodik a működése. Van Vhy és mtsai immunhisztokémiai vizsgálatai szerint, a posztisztkémiás szakban a HSP72 lokalizációja és granuláris mintázata megegyezik az iszkémia hatására transzlokálódott NKA molekulák elrendeződésével [13]. Saját immunhisztokémiai vizsgálataink során elsőként mutattuk ki, hogy nemi különbség van a HSP72 és a NKA posztisztkémiás elhelyezkedésében. Nőstényekben a HSP72 inkább a proximális tubulussejtek bazolaterális membránján lokalizálódik, az iszkémia hatására sem mozdul el onnan, míg hímekben gyengébb festődést láttunk, főleg a citoszól területén. Mindezek az eredmények alátámasztják az irodalmi adatokat, hogy a HSP72 chaperone funkciója révén részt vesz a NKA molekulák visszarendezésében és ezáltal az enzim funkciójának helyreállításában.

A nemi hormonok vizsgálatára kísérleteinket megismételtük kasztrált és DHEA, mint ösztrogén hatású hormonnal kezelt állatok csoportjain. A nemek között megfigyelt különbség elsősorban a hímekben meglévő androgén hormonok szintézisével állhat összefüggésben, minthogy a kasztráció és a DHEA kezelés javította a túlélést és csökkentette a vesekárosodást. Hasonlóan az ivarérett nőstény állatokhoz, a NKA és a HSP72 mind bazális, mind posztisztkémiás szintje -a DHEA kezelt és a kasztrált csoportokban egyaránt- meghaladta az ivarérett kontrollokét, bár a kasztráció jótékony hatása kifejezettebbnek bizonyult. Korábbi

eredményeinket figyelembevéve felmerül, hogy a kezelt csoportok esetében a vese enyhébb strukturális és funkcionális károsodásának, illetve a kedvezőbb posztisztkémiás túlélésnek a háttérében a NKA funkció megtartása fontos faktor lehet.

A női nem ismerten protektív számos szervben az I/R károsodással szemben. Elsősorban az ösztrogének hatásának tulajdonítják ezt a protektív hatást. Béta-ösztadiol adásával javítani lehet a miokardiális iszémia okozta hemodinamikai elváltozásokat és csökkenteni lehet a kialakult infarcerálódott terület nagyságát. Kísérletünkben a hím állatok nem kaptak ösztadiol kezelést. Ugyanakkor az androgén hormonok szintjének csökkenése a kasztrációt követően, illetve az ösztrogén hatású DHEA hormonnal történt kezelés az androgén-ösztadiol arány megváltozását is okozhatta. Feltételezhető, hogy az iszkémiás károsodás csökkentésében nem önmagában az egyik hormon túlsúlya, vagy a másik hiánya, hanem a hormonok aránya játszhat szerepet.

3. KLINIKAI VIZSGÁLATOK: A HSP72 gén (*HSPA1B*) polimorfizmusok jelentősége vesebetegségekben

3.1. Előzmények

A hormonális és környezeti hatások mellett egyes fehérjék expresszióját genetikai polimorfizmusok is nagymértékben befolyásolják. A HSP70-s család három tagját (HSP72, HSP73 és HSP70-hom) kódoló gének a 6-os kromoszóma rövid karján, a 6p21 lokuszon található. Ez a terület felelős a HSP70 fehérjecsald mellett az MHC II (HLA-DRB1, HLA-DQB1) valamint MHC III régiót alkotó (TNF- α , TNF- β) fehérjék kódolásáért is. A régió fehérjéinek fontos szerepe van az antigének felismerésében és a T-sejt mediált immunválasz beindításában is. A HSP72 chaperone funkcióján kívül, toll-like receptorok (TLR) serkentésén keresztül részt vesz a proinflammatorikus kaszkád aktiválásában

A HSP70 család legfontosabb genetikai polimorfizmusait az alábbi táblázat foglalja össze.

gén	fehérje	polimorfizmus	pozíció	funkció
<i>HSPA1B</i>	HSP72	A1267G	kódoló szakasz	G hordozás a HSP72 mRNS szint csökkenésével járhat
		G1538A	promoter régió	?
<i>HSPA1A</i>	HSP73	G190C	5' UT régió	silent mutáció, szerepe még ismeretlen
		A110C	promoter régió	szerepe még ismeretlen
<i>HSPA1C</i>	HSP70-hom	T2437C	peptidkötő régió	Metionin –Threonin csere, szerepe még ismeretlen

3. táblázat. A humán HSP70 család génpolimorfizmusai

Bár sem kísérletes, sem klinikai tanulmányok nem támasztották alá egyértelműen a genetikai polimorfizmusok HSP70 mRNS, illetve fehérje expresszióra kifejtett közvetlen szabályozó szerepét, a HSP70 gének polimorfizmusainak jelentőségét számos immunmediált folyamatban kimutatták. A HSP72 genetikai variációi számos esetben jelentősen befolyásolják egyes kórfolyamatok morbiditását és a kimenetelét. Az 1267G allélt hordozók gyakrabban betegszenek meg asztmában, Basedow-Graves kórban, reumatoid artritiszben valamint SLE-ben [14]. Kimutatták továbbá, hogy az (1267)GG genotípust hordozó nők között szignifikánsan nagyobb az emlőrák és egyes nőgyógyászati daganatok előfordulásának rizikója [15].

Több vizsgálat igazolta az (1267)G allél hordozás káros hatását iszkémiás károsodás során is. Akut miokardiális infarktust és agyi hipoxiát követően jelentős különbség mutatkozott a túlélésben és az iszkémiás terület kiterjedésében az egyes *HSPA1B* genotípusok hordozói között [16].

A TLR-ről Agnese és mtsai a *TLR4* A(896)G helyen egy A-G szubsztitúciót írtak le, mely egy aszpartámsav-glicin cserét eredményezve a Gram negatív infekciók fokozott kockázatával [18], csökkent gyulladáshoz való válaszzel és proinflammatorikus citokin-termeléssel jár [17]

Előző vizsgálatunkban kimutattuk, hogy az akut veseelégtelenség előfordulásának rizikója, minden egyéb hajlamosító tényezőtől függetlenül szignifikánsan nagyobb a *HSPA1B* (1267)GG genotípusú koraszülöttek között [19], ami további kérdéseket vet fel a *HSP72* polimorfizmusok és a vesebetegségek összefüggését illetően.

3.2. Kérdéscsoportok- A kutatás célja

- A. Vesetranszplantált és egészséges populációban (felnőtt ill. gyermek) között van-e különbség a *HSPA1B* A(1267)G, valamint a *TLR4* A(896)G polimorfizmusok eloszlásában?**
- B. Kimutatható-e összefüggés *HSPA1B* A(1267)G, a *HSPA1A* G(190)C és a *TLR4* A(896)G genetikai polimorfizmusai valamint a vesetranszplantátum túlélése felnőtt illetve gyermek populációban között?**
- C. Van-e összefüggés fenti polimorfizmusok és a végállapotú veseelégtelenség kialakulásához vezető recidív húgyúti infekciók illetve anatómiai malformációk között?**

3.3. Módszerek

3.3.1. Vizsgálati csoport, betegek jellemzése

1. Vesetranszplantált populációk

Vizsgálatainkba a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti klinikáján, az I.sz. Gyermekklinikán és a prágai Egyetem Transzplantációs Centrumában gondozott vesetranszplantált beteget vontunk be. A betegek klinikai adatait, a beleegyező nyilatkozatok kitöltése után adatbázisban rögzítettük: kor, nem, korábbi családi, transzplantációs és egyéni anamnézis, vérnyomás, szérum BUN, kreatinin, vérzsír értékek, rejekeciók száma, alapvesebetegség, dialízis módja, időtartama, donor kora, iszkémiás idő hossza, immunszuppresszív terápia.

Felnőttek

Tx15 csoport: 48 kadaverből származó vesetranszplantáción átesett beteg, 15 éven keresztül jól működő grafftal és megtartott vesefunkcióval (kor: 54.1 ± 11.0 év; ffi/nő: 22/26). Immunszuppresszív kezelés: azathioprin és prednizolon, kivétel 2 esetben, akik májbetegség miatt azathioprin helyett mycopenolol mofetil-t kaptak.

Tx csoport: 105 beteg (kor: 54.8 ± 12.6 év; ffi/nő: 73/32) közülük 95 kadaver és 10 beteg élődonoros transzplantációban részesült. Az immunszuppresszív terápia standard hármas kezeléssel alapult: ciklosporin, azathioprin és prednizolon. Az akut rejekeciókat metil-prednizolonnal vagy rezisztencia esetén T-sejt ellenes antitestekkel kezelték. Mindegyik Tx beteg stabil vesefunkciókkal rendelkezett a transzplantációt követő 12 hónapban.

Akut rejekeció (AR) csoport: 19 kadaver és 2 élő donoros transzplantált beteg (kor: 45.6 ± 11.0 év; ffi/nő: 12/9), akik a transzplantációt követő első évben vesebiopszia által bizonyított akut rejekeció miatt veszítették el a graftjukat. Az immunszuppresszív terápia megegyezett a Tx csoporttal.

Gyermekek

1991 és 2006 között gondozott, 41 vesetranszplantált gyermek került be a vizsgálatba (kor: 18.5 ± 5.8 év; fiú/lány:25/16). Immunszuppresszív kezelésként standard hármastherápiát kaptak: ciklosporin vagy tacrolimus, azathioprin és prednizolon. Két beteg részesült rapamicin terápiában. Az akut rejekeciókat metil-prednizolonnal kezelték.

2. Recidív húgyúti fertőzésben (UTI) szenvedő gyermekek

Vizsgálatainkban a Hetényi Géza Kórház Gyermekosztályán UTI-val gondozott 103 gyermek (kor: 7.3 ± 6.9 év; fiú/lány:22/81) adatai kerültek feldolgozásra. UTI-t piúria, szignifikáns bakteriúria együttes fennállásakor diagnosztizáltak. A vesehegesedés, illetve a veseparenchimalézió kimutatására az akut gyulladás lezajlása után minimum 5 hónap elteltét követően került sor DMSA alkalmazásával.

Vezikoureterális refluxot (VUR) 50 betegnél (38 lány/12fiú) észleltek, 28 esetben unilaterális (bal 13, jobb 15), míg 22 gyermeknél bilaterális refluxot mutattak ki. Magasfokú VUR-t (IV-V) 19 betegnél, míg 31 esetben enyhe (I-III) VUR-t detektáltak. 38 betegnél került sor sebészi beavatkozásra, míg a többiek konzervatív terápiában részesültek.

A veseparenchima hegesedése 40 betegnél alakult ki (30 lány/10fiú), elsősorban a súlyosabb fokú VUR-ban szenvedő betegek esetében, függetlenül attól, hogy uni-, vagy bilaterális VUR állt a háttérben. Azokban az esetekben, ahol a betegeknek visszatérő húgyúti infekciója alakult ki, a vesehegesedés kialakulása a VUR fokától függetlenül hasonló prevalenciát mutatott.

3. Egészséges kontrollok

A felnőtt populáció kontrolljaként 130 egészséges véradó (kor: 58.5 ± 11.3 év; ffi/nő: 71/60), míg a gyermekek esetében 235 egészséges újszülött vérmintái és adatai kerültek feldolgozásra.

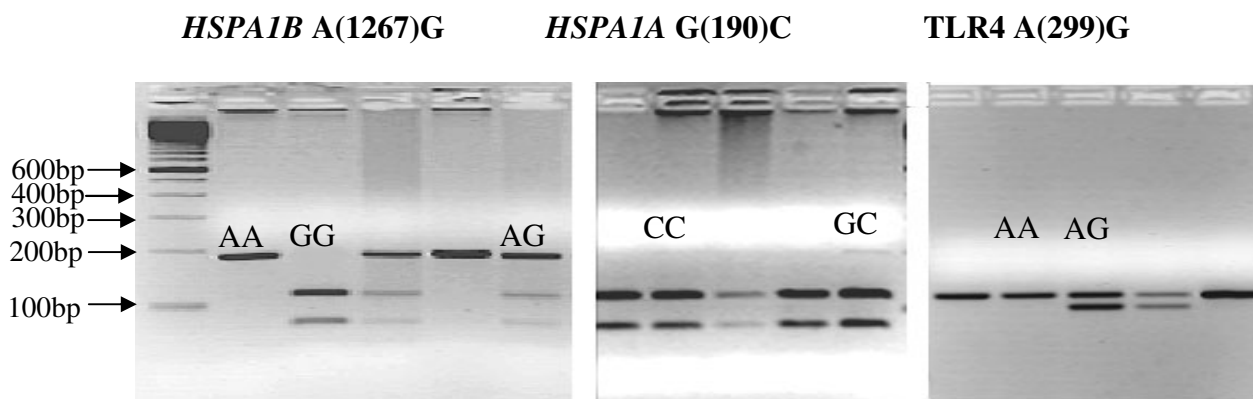
3.3.2. A HSPA1B A(1267)G és TLR4 A(299)G polimorfizmus meghatározása

A genomiális DNS-t perifériás vérmintákból standard fenol-kloroformos eljárással vontuk ki. A PCR-reakciókat 50 µl végtérfogatú reakcióelegyben (5 µl 10x PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1,5U Taq polimeráz (Gibco) és 0,5-0,5 µM primerek végeztük, majd etídium-bromiddal festett 3%-os agaróz gélen detektáltuk.

A HSPA1A G(190)C PCR detektálását 61°C anellációs hőmérsékleten (38 ciklus) 5'-CGACCTGGGCACCACCTACTCC-3' és 5'-AATCAGGCGCTTCGCGTCAAAC-3', majd 196bp nagyságú terméket *BsrBI* (Sigma I) restrikciós endonukleázzal emésztettük

A HSPA1B A(1267)G genetikai polimorfizmus detektálásához a DNS mintákat 66°C-on (40 ciklus) specifikus: 5'-CGC CGC TGT CGC TGG GTC TGG AG-3' és 5'-GGC GGC CCT TGT GTC TGG TGA TGG-3' primerekkel amplifikáltuk, majd a keletkezett 327 bp nagyságú terméket *Pst I* (Sigma) enzimmel emésztettük.

A TLR4 A(299)G genetikai polimorfizmus vizsgálatához: 5'-CTT ATA AGT GTC TGA ACT CCC-3' és: 5'- TAC CAG CAC GAC TGC TCAG- 3'' primereket használtunk, 59°C-on (35 ciklus). A 249 bp nagyságú DNS terméket *NcoI* (Sigma) enzimmel hasítottuk.



11. ábra A HSPA1 gén illetve a TLR4 genetikai polimorfizmusok genotipizálásának reprezentatív képe. Az ábra bal oldalán az egyes fragmentumok nagyságát jelző molekulásúly markert tüntettük fel.

3.4. Eredmények

3.4.1. A HSPA1A G(190)C, HSPA1B A(1267)G és a TLR4 A(299)G genotípusok megoszlása felnőtt vesetranszplantált populációban

HSPA1A G(190)C genotípusok megoszlásában és az allélfrekvenciában nem volt különbség az egyes csoportok között (4. táblázat).

A HSPA1B (1267)AA genotípus ritkábban fordult elő a Tx csoportban a kontrollokhöz és a Tx15 csoporthoz viszonyítva. A HSPA1B (1267)GG nagyobb arányban jelentkezett mind a Tx, mind a Tx15 csoportban a kontrollokhöz képest. A HSPA1B (1267)G allél gyakoribb volt a Tx csoportban a kontrollokhöz ($P=0.024$; OR: 1.46; CI: 1.01–2.11) és a Tx15 csoporthoz viszonyítva ($P=0.02$; OR:4.31; CI: 1.19–15.25).

A TLR4 A(299)AG genotípus gyakoribb volt és a TLR4 (299)G allél gyakrabban fordult elő a Tx15($P=0.02$; OR: 4.531; CI: 1.156–14.19), mint a Tx15 csoportban.

Polimorfizmus	n	HSPA1A G(190)C			HSPA1B A(1267)G			TLR4 A(299)G		
		GG	GC	CC	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Egészséges kontrollok	131	2 (2%)	8 (6%)	121 (92%)	24* (18%)	93 (70%)	14^x (12%)	120 (92%)	11 (8%)	0 (0%)
Tx	105	0 (0%)	5 (5%)	100 (95%)	6^{&} (6%)	81 (77%)	18[§] (17%)	101 (96%)	4[#] (4%)	0 (0%)
Tx15	48	0 (0%)	6 (12%)	42 (88%)	9 (18%)	36 (76%)	3 (6%)	41 (86%)	7 (14%)	0 (0%)
AR	21	0 (0%)	3 (14%)	18 (86%)	3 (14%)	13 (62%)	5 (24%)	21 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

4. táblázat A HSPA1A G(190)C, HSPA1B A(1267)G és a TLR4 A(869)C genotípusok megoszlása felnőtt vesetranszplantált populációban

* $P=0,004$ versus Tx: AA versus AG (OR: 3.4; CI: 1.35–8.94); ^x $P=0,002$ versus Tx: AA versus GG (OR: 5.1; CI: 1.65–16.0); [&] $P=0,02$ versus Tx15: AA versus AG (OR: 0.29; CI: 0.09–0.89); [§] $P< 0,005$ versus Tx15: AA versus GG (OR: 0.11; CI: 0.02–0.55); [#] $P=0,02$ versus Tx15 (OR: 4.31; CI: 1.19–15.25).

3.4.2. A HSPA1A G(190)C, és a TLR4 A(299)G genotípusok illetve a klinikai és demográfiai adatok közötti összefüggések felnőtt vesetranszplantált populációban

A recipiensek klinikai mutatóit az alábbi táblázatok mutatják. A HSPA1A G(190)C genotípus esetében nem találtunk összefüggést, ezért az adatokat nem mutatjuk részletesen.

HSPA1B A(1267)G	AA			AG			GG		
	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR
<i>Csoportok</i>									
n	6	9	3	81	36	13	18	3	5
Férfi/Nő	3/3	6/3	2/1	58/23	16/20	5/7	12/6	0/3	2/3
Kor (év)	48 ±15	54 ±12	46±13	53 ±13	54 ±10	45±12	53 ±11	48±12	34±20
Kreatinin (µmol/L)	108 ±16*	140±63*	600±101	147±49*	152±86*	607±220	159±48*	115±42*	800±250
Proteinúria, g/day	1.4±0.5*	1.3±0.2*	3.1±1.7	1.1±0.4*	1.6±0.8*	3.2±2.1	1.1±0.4	1.3±0.7	ND
Koleszterin (mmol/L)	6.3±1.1	5.8±0.8	3.8±2.1	6.0±1.3	5.9±1.6	6.0±1.7	6.0±1.3	5.6±1.1	5.6±2.8
Triglicerid (mmol/L)	1.8±1.0	2.2±0.7	ND	2.5±1.2	1.8±0.8	2.5±0.9	2.8±1.5	1.2±0.1	2.5±1.5
BMI (kg/m ²)	25.7±4.1	24.1±2.1	22.1±3	27.2±5.2	24.7±4.0	24±1.0	27.1±4.8	25.5±1.5	22±21
Hipertónia %	33.3 ^x	77	30 ^x	32.9 ^x	75	90 ^x	33 ^x	44	66 ^x
Akut rejeckció, %	16.7	33	100	24.7	27	100	39	0	100

5. táblázat A HSPA1B A(1267)G genotípusok és a klinikai adatok összefüggése ^xP<0,05 versus Tx15 és AR; *P<0,05 versus AR

TLR4 A(299)G	AA			AG			GG		
	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR
<i>Csoportok</i>									
n	100	41	21	5	7	-	-	-	-
Férfi/Nő	69/31	19/22	12/9	5/0	3/4	-	-	-	-
Kor (év)	53±12	54±12	45±12	57±13	49±11	-	-	-	-
Kreatinin (µmol/L)	147±48*	150±80*	645±220	139±38	130±32	-	-	-	-
Proteinúria, g/day	1.1±0.4*	1.5±0.7*	2.9±2.6	0.9±0.2	1.4±0.3	-	-	-	-
Koleszterin (mmol/L)	6.0±1.2	5.8±1.4	5.0±1.2	6.4±0.8	6.4±3.4	-	-	-	-
Triglicerid (mmol/L)	2.5±1.3	1.8±0.8	2.2±0.9	2.5±1.7	2.4±1.4	-	-	-	-
BMI (kg/m ²)	27.0±4.6	24.8±4.7	24±0.7	29.8±6.4	23.8±2.9	-	-	-	-
Hipertónia %	35 ^x	68	80	50 ^x	85	-	-	-	-
Akut rejeckció, %	31	26	100	25	28	-	-	-	-

6. táblázat TLR4 A(299)G genotípusok és a klinikai adatok összefüggése ^xP<0,05 versus Tx15 és AR, *P<0,05 versus AR

3.4.3. A HSPA1A G(190)C, HSPA1B A(1267)G és a TLR4 A(299)G genotípusok megoszlása gyermek vesetranszplantált populációban

A HSPA1A G(190)C illetve a TLR4 A(299)G genotípusok megoszlásában és az allélfrekvenciában - feltehetően a kis esetszámok miatt - nem volt különbség az egyes csoportok között (7. táblázat).

A HSPA1B (1267)GG genotípus gyakoribb volt mind Tx (p=0,014), mind a VUR-os (p=0,0072) csoportban a kontrollokhoz képest. A heterozigóta AG genotípus ritkább volt a VUR-osokban, mind a nem VUR-osok (0,007), illetve az összes transzplantálthoz (p=0,045) képest. Ezzel szemben a HSPA1B (1267)GG homozigóta genotípusnál ez pont fordítva érvényesült. A TLR4 esetében nem találtunk szignifikáns eltérést. (7. táblázat)

Polimorfizmus	n	HSPA1A G(190)C			HSPA1B A(1267)G			TLR4 A(299)G		
		GG	GC	CC	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Egészséges kontrollok	65	1 (1.5%)	2 (3%)	62 (95.5%)	17* (26%)	39 (60%)	9 ^x (14%)	59 (90%)	6 (10%)	0 (0%)
Tx gyerekek	41	0 (0%)	0 (0%)	41 (100%)	1 (2%)	29 (71%)	11 [§] (27%)	39 (96%)	2 (4%)	0 (0%)
Nincs VUR-ja	26	0 (0%)	0 (0%)	26 (100%)	0 (0%)	23 (12%)	3 ^{&} (88%)	25 (96%)	1 (4%)	0 (0%)
Van VUR-ja	15	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)	1 (6%)	6 (40%)	8 (54%)	14 (94%)	1 (6%)	0 (0%)

7. táblázat A HSPA1A G(190)C, HSPA1B A(1267)G és a TLR4 A(869)C genotípusok megoszlása gyermek vesetranszplantált populációban

* $P=0,004$ versus Tx: AA versus AG (OR: 12.6; CI: 1.58–100); ^x $P=0.014$ versus Tx: AA versus GG (OR: 20.8; CI: 2.3–187); [&] $P=0,07$ versus VUR: AG versus GG (OR: 0.1; CI: 0.09–0.48); [§] $P=0,045$ versus VUR: AG versus GG (OR: 3.5; CI: 0.99–12.46)

3.4.4. A HSPA1A G(190)C, és a TLR4 A(299)G genotípusok illetve a klinikai és demográfiai adatok közötti összefüggések gyermek vesetranszplantált populációban

A transzplantált gyermekek életkora 18.6 ± 6 év volt (nincs VUR: 18.2 ± 5 , van VUR: 19.9 ± 7) nemi megoszlás lány/fiú: 17/24 (nincs VUR: 12/14, van VUR: 5/10). A klinikai mutatókban kizárólag a szérum triglicerid szint mutatott eltérést: nincs VUR versus van VUR: 1.6 ± 0.7 versus 2.3 ± 1.1 $P < 0.05$.

3.4.5. A HSPA1B A(1267)G és a TLR4 A(299)G genotípusok és allélfrekvenciák megoszlása recidív húgyúti infekcióban szenvedő gyermekek között

A HSPA1B A(1267)G és a TLR4 A(299)G genotípusok és az egyes allélfrekvenciák megoszlását az alábbi három táblázat (8.9.10) mutatja.

A HSPA1B (1267)GG genotípus és a HSPA1B (1267)G allél gyakrabban fordult elő az UTI betegekben, mint a kontrollokban és mind a GG genotípus, mind a G allél hordozása növelte a vesehegesedés rizikóját. A GG genotípus és a hegesedés közötti összefüggés szignifikáns maradt akkor is, ha a magasfokú VUR fennállására, mint elsődleges rizikótényezőre vonatkoztattuk.

A TLR4 (896)AG genotípus és a TLR4 (896)G allél szintén gyakoribb volt az UTI páciensek között. Mind az AG genotípus, mind a G allél hordozás gyakrabban fordult elő azokban az UTI páciensekben, akiknél nem állt VUR az infekciók hátterében.

Csoport	N	HSPA1B A(1267)G			TLR4 A(299)G		
		AA	AG	GG	AA	AG	GG
Egészséges kontroll	235	93 (40%)	119 (50%)	23 (10%)	218 (92%)	17 (8%)	0 (0%)
UTI betegek	103	12 (11%)	77 (75%)	14* (14%)	88 (86%)	15† (14%)	0 (0%)
Vesehegesedés van	40	2 (5%)	29 (72%)	9** (23%)	35 (12%)	5 (88%)	0 (0%)
Vesehegesedés nincs	63	10 (16%)	48 (76%)	5 (8%)	53 (84%)	10 (16%)	0 (0%)
VUR van	50	9 (18%)	39 (72%)	5 (10%)	46 (92%)	4 (8%)	0 (0%)
VUR nincs	53	3 (6%)	38 (76%)	9 (18%)	42 (80%)	11‡ (20%)	0 (0%)

8. táblázat. *HSPA1B* A(1267)G and *TLR4* A(299)G genotípusok megoszlása recidív húgyúti infekcióban (ÚTI) szenvedő gyermekekben

* $P=0,0001$ versus egészséges kontroll ($P=0.0001$ (OR:1.92, CI:1.38-2.68); ** $P=0,012$ versus vesehegesedés van; † $P=0,031$ versus egészséges kontroll (OR:2.18, 95% CI:1.46-4.56), ‡ $P=0.05$ versus VUR van (OR:3.01 95% CI:0.99-10.1))

Csoport	N	<i>HSPA1B</i> A(1267)G		<i>TLR4</i> A(299)G	
		A	G	A	G
Egészséges kontroll	235	305	165	453	17
UTI betegek	103	101	105*	191	15†
Vesehegesedés van	40	33	47**	75	5
Vesehegesedés nincs	63	68	58	116	10
VUR van	50	51	49	98	4
VUR nincs	53	44	62	93	11‡

9. táblázat. *HSPA1B* A(1267)G and *TLR4* A(299)G allélfrekvenvciák megoszlása recidív húgyúti infekcióban (UTI) szenvedő gyermekekben

* $P=0,0001$ versus egészséges kontroll (OR:1.92, CI:1.38-2.68); ** $p=0,049$ versus vesehegesedés nincs (OR:1.67, 95% CI:1.0 -2.94); † $P=0,041$ versus egészséges kontroll (OR:2.71, 95% CI:1.33-4.12); ‡ $P=0,03$ versus VUR van (OR:2.89, 95% CI:0.92-9.82)

<i>HSPA1B</i> A(1267)G és <i>TLR4</i> A(299)G	Egészséges kontroll(%)	UTI betegek (%)
N	235	103
(1267)AA+(896)AA	41 (17%)	10 (10%)
(1267)AA+(896)AG	6 (2%)	2 (2%)
(1267)AA+(896)GG	0 (0%)	0 (0%)
(1267)AG+(896)AA	151 (64.5%)	66 (65%)
(1267)AG+(896)AG	13 (5%)	11 (10%)*
(1267)AG+(896)GG	0 (0%)	0 (0%)
(1267)GG+(896)AA	22 (9.5%)	11 (10%)
(1267)GG+(896)AG	2 (1%)	3 (3%)
(1267)GG+(896)GG	0 (0%)	0 (0%)

10.táblázat Az UTI kialakulásának kockázata a *HSPA1B* A(1267)G és *TLR4* A(299)G polimorfizmusok különböző kombinált genotípusaiban.

* $P=0,05$ versus egészséges kontroll (OR:1.93, 95% CI:0.97-4.54)

Az UTI kialakulásának kockázata azokban a betegekben volt a legnagyobb, akik mindkét polimorfizmus esetében a G allélt hordozták.

3.5. Megbeszélés-Következtetések

Napjainkban népegészségügyi problémát jelent és egyre nő a krónikus veseelégtelenség (CRF) miatt nefrológiai kezelésre – vesepótló kezelésre vagy veseátültetésre szoruló betegek száma. Számos, a beszámoló elején is vizsgált alloantigéntől független faktor (iszkémias károsodás, immunszuppresszív terápia stb.) mellett, a genetikai predispozíció meghatározó jelentőségű a vesetranszplantátum túlélésében.

Klinikai vizsgálatainkban vesetranszplantált felnőtt és gyermek populációban, illetve visszatérő UTI-ban szenvedő gyermekekben vizsgáltuk a CRF patomechanizmusában kulcsszerepet játszó HSP72 fehérjét kódoló *HSPA1B* A(1267)G és a *TLR4* fehérjét kódoló *TLR4* A(896)G genetikai polimorfizmusok előfordulását.

Ezek a fehérjék alapvető fontosságúak a szervezet natív védekezőképességében. A TLR4 a Gram-negatív baktériumok okozta fertőzések leküzdésében nélkülözhetetlen [20], a HSP72 pedig a veseszövet regenerálódásában bír kiemelkedő szereppel [21]. A HSP72-ről kimutatták továbbá, hogy a transzplantáció során is fellépő iszkémia hatására expressziója megnő, jelenléte elengedhetetlen a tubulussejtek I/R károsodásának kivédéséhez. *In vivo* transzplantációs modellen igazolták, hogy elnyújtott iszkémiás időszakot követően, a graftok túlélése korrelált a HSP72 szintjével, ami alátámasztja a HSP72 protektív szerepét a vesetranszplantáció kimenetelében.

Mindkét fehérje esetében ismertek genetikai polimorfizmusok, melyek befolyásolják a vizsgált fehérje mRNS expresszióját. A *HSPA1B* A(1267)G polimorfizmus a HSP72 mRNS expresszió csökkenését eredményezi [14], melynek következtében a HSP72 védő funkciója károsodhat. A *TLR4* A(299)G polimorfizmusról ismert, hogy csökkent immunválaszt eredményez [17]. Bár a *HSPA1B* A(1267)G polimorfizmus szerepét számos iszkémiával összefüggő kórállapotban leírták, munkacsoportunk elsőként mutatott ki összefüggést vesetranszplantált betegekben a *HSPA1B* A(1267)G és *TLR4* A(896)G genetikai polimorfizmusok és a renális graftok hosszútávú túlélése között.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a *HSPA1B* (1267)AA genotípus gyakoribb az egészséges és a hosszútávon jól működő graffal élő Tx15 populációban, mint a többi vesetranszplantált betegben. Ezzel szemben a csökkent HSP72 szinttel járó (1267)GG genotípus a transzplantáltak között és az akut rejekciót elszenvedő betegek között fordult elő nagyobb arányban. Mindez arra utal, hogy nem csak az (1267)AA genotípus csökkent előfordulása, hanem önmagában a (1267)GG gyakoribb jelenléte is jelentősen befolyásolja a graft túlélését és az akut rejekció kialakulását. Eredményeink azt mutatják, hogy az egészséges kontroll populáció és a hosszú távon jól működő graffal élő Tx15 betegek hasonló genetikai mintázattal bírnak a *HSPA1B* A(1267)G genotípust illetően. Ez arra utal, hogy ők az egészségesekéhez hasonló, fiziológiás védekezőképességgel rendelkeznek a transzplantáció és az akut rejekcióhoz vezető rizikófaktorokkal szemben.

A HSP72-ről ismert, hogy aktiválja a TLR2, TLR4 és interleukin-2 útvonalakat is, melyek fontosak a gyulladáshoz való válaszreakció kiváltásában. Kimutattuk, hogy *TLR4* (299)AG genotípus illetve a G allél jelenléte gyakoribb a hosszú távon jól működő graffal élők között, mint a többi vesetranszplantált, illetve akut rejekción átesett betegben. Mindezek alapján feltételezhető, hogy transzplantációt követően a csökkent immunológiai válaszkészséggel járó (299)AG genotípus hordozása előnyt jelenthet a graft túlélésének szempontjából. Hipotézisünket támasztja alá az is, hogy a *TLR4* (299)G allélről a közelmúltban igazolták, hogy csökkent gyulladáshoz való válaszkészséggel, proinflammatorikus citokin-expresszióval és akut fázis fehérje indukcióval jár [22].

Az is valószínű, hogy a TLR-k önmagukban szerepet játszanak az allograft rejekcióban, mivel TLR knock out modellben az állatoknál egyáltalán nem alakult ki kilökődés, még inkompatibilis graft esetében sem [23,24]. Tüdőtranszplantált betegeknél kimutatták, hogy a *TLR4* (299)AG genotípusú betegek esetében csökkent az akut rejekciók száma [25], ami megegyezik az általunk vesetranszplantáltakban észlelt eredményekkel. Felnőtt transzplantált betegeken végzett vizsgálataink tehát arra utalnak, hogy a recipiens genetikai predispozíciója a HSP72 csökkent termelésére, illetve a TLR4 aktivációjára vonatkozóan befolyásolhatja a graftok hosszútávú túlélését.

Gyermekkorban a vesetranszplantációhoz vezető leggyakoribb ok a kongenitális fejlődési rendellenesség talaján kialakuló CRF, melynek hátterében az obstruktív uropátia, az aplázia, hipoplázia, diszplázia, illetve a VUR következtében kialakuló reflux-nefropátia [26] áll. Európában a gyermekkori CRF 10-24%-t az UTI szövődményeként fellépő vesehegyesedés okozza [27].

Gyermeken végzett vizsgálataink során kimutattuk, hogy a *HSPA1B* (1267)G allélt hordozók gyakrabban szenvednek el UTI-t, sőt a veseparenchima lézió prevalenciája is

nagyobb ezekben a betegekben. Eredményeink tovább erősítik azt a korábbi feltételezést, hogy a csökkent HSP72 fehérjeszinttel járó *HSPA1B* (1267)GG genotípusú, illetve a *HSPA1B* (1267)G allélt hordozó egyedekben csökken a HSP72 mennyisége és/vagy protektív funkciója, ami fogékonyabbá teheti őket egyebek mellett, a húgyúti infekciókkal szemben is [28].

A HSP72 fehérje másik jelentős szerepe a már többször említett regeneráló képessége, ami különösen a vese esetében kifejezett. Ha a G allélt hordozóknál ez a protektív faktor kiesik, akkor a veseszövet jobban károsodik a gyulladással mechanizmusok során, ami végső soron a vese hegesedését eredményezheti. Ez a feltevés magyarázza a renális parenchima lézióban szenvedő betegekben a *HSPA1B* (1267)GG genotípus, illetve a *HSPA1B* (1267)G allél gyakoribb előfordulását.

Vizsgálatainkban a *HSPA1B* (1267)GG genotípus, és a *HSPA1B* (1267)G allél hordozása gyakrabban fordult elő mind a transzplantációra kerülő, mind az UTI-ban szenvedő gyermekeknél az egészségesekhez viszonyítva. Ezzel elsőként világítottunk rá arra, hogy ez a genetikai polimorfizmus is szerepet játszhat UTI és CRF kialakulásában. Feltehetően a HSP72 védelmező mechanizmusának kiesése vezet a húgyutak nagyobb érzékenységéhez fertőzésekkel és egyéb vesekárosító ágensekkel szemben.

Mindezek alapján a *HSPA1B* (1267)GG genotípusú illetve a *HSPA1B* (1267)G allélt hordozó UTI-s, illetve egyéb vesét érintő betegségben szenvedőknél az irreverzibilis vesekárosodás megelőzésére agresszívabb kivizsgálási és kezelési elvek mérlegelése merülhet fel.

A TLR4 központi szereppel bír elsősorban az *E.coli* által kiváltott pielonefritisz elleni védelemben. Erre utal, hogy a vesetubulusok epitelsejtjei TLR-okat expresszálnak gyulladással betegségekben. Inaktív TLR4-et hordozó egértörzs és vad törzs *E.coli* infekciója kapcsán bizonyították a vesetubulus hámsejtek aktív részvételét az immunválaszban, elsősorban TLR4 szignalizációs úton [29]. A HSP72, a TLR4 belső aktivátoraként [30] segít fertőzések leküzdésében. Felmerül, hogy a HSP72 mellett, a TLR4 genetikai polimorfizmusai is szerepet játszhatnak a húgyúti fertőzésekkel szemben mutatott eltérő védekezőképességben.

Kimutattuk, hogy a *TLR4* (896)AG genotípus és a *TLR4* (896)G allél hordozás is emelkedett UTI kockázattal jár, és elsősorban a VUR nélküli UTI-s betegeket jellemzi. Ez arra utal, hogy a TLR4 polimorfizmusa, az anatómiai tényezőktől függetlenül is, befolyásolja a szervezet védekezőképességét a húgyúti fertőzésekkel szemben. Feltehetően a *TLR4* (896)G allél hordozása esetén, a Gram-negatív baktériumok elleni csökkent válaszkészség okozza az infekcióval szembeni nagyobb fogékonytságot. Adataink is arra utalnak, hogy ezen genetikai variáció hordozói - a vese- és húgyutak anatómiai eltérései nélkül is - fokozottan veszélyeztetettek a húgyúti gyulladásokra. Homozigóta GG genotípust a TLR4 esetében nem találtunk sem ebben a kísérletben, sem korábbi vizsgálataink során és irodalmi adat sem áll rendelkezésre. Feltehetően ez a genetikai variáció az immunrendszer súlyos fokú károsodása miatt az élettel összeegyeztethetetlen.

Eredményeinkből kiderül, hogy a *HSPA1B* (1267)AG és a *TLR4* (896)AG genotípus együttes hordozása fokozottan hajlamosít UTI kialakulására, összehasonlítva az összes többi genotípus-kombinációval. Ez arra utal, hogy mindkét fehérje esetében már elegendő a G allél hordozása a csökkent fehérjefunkció kialakulásához, ugyanakkor a homozigóta vad genotípus protektív a homozigóta mutánsokhoz képest.

Míg az UTI vizsgálati csoportban mindkét fehérje polimorfizmusa különbséget mutat a kontrollokhoz képest, addig a vesetranszplantált gyermekeknél csak a *HSPA1B* A (1267)G esetében találtunk eltérést az egyes vizsgálati csoportok között. A *HSPA1B* (1267)GG genotípus gyakrabban fordult elő a transzplantációra kerülő gyermekeknél az egészségesekhez képest. Feltételezhető az egészséges gyermekek esetében az AA genotípus protektív szerepe bármilyen vesekárosító ágenssel szemben. Ugyanakkor a GG genotípus,

valószínűleg a csökkent védekezőképesség miatt, vezet a vese korai károsodásához, CRF-hez, és végül vesetranszplantációhoz.

A *TLR4* A(896)G polimorfizmus esetében nem volt különbség a különböző csoportok között. Ez azzal magyarázható, hogy a *TLR4* elsősorban fertőző, illetve gyulladási folyamatokban játszik szerepet, a *HSP72* ugyanakkor a hipoxiával, iszkémiával, hiperoxiával és egyéb noxiával szembeni védelemben, a veseszövet regenerációjában is kulcsfontosságú.

Hasonlóan az UTI-ban észlelt különbségekhez, a transzplantált gyermekeknél is megfigyeltük, hogy a VUR-osok között nagyobb volt a *HSPA1B* (1267)GG genotípus prevalenciája a kontrollokhoz képest. Erre magyarázatot adhat a UTI következtében kialakult veseheggesedéssel kapcsolatban talált eredményünk, mely szerint gyakrabban alakul ki veseheggesedés ezen G allél hordozása esetén. A VUR pedig egyértelmű rizikótényezőként szerepel az UTI-k patomechanizmusában. Továbbá maga a VUR is hajlamosít vesekárosodásra, és reflux-nefropátia kialakulásával CRF-hez is vezethet.

Transzplantált betegeinknél tehát kimutattuk, hogy a *HSPA1B* (1267)G allél hordozása CRF kialakulására hajlamosít. Ezt is támasztja alá az az elképzelés, mely szerint a csökkent *HSP72* szintet jelentő G allél hatására a vese regenerációs képessége is csökkenhet. Nem találtunk különbséget a fejlődési rendellenességgel rendelkező gyermekek és az ép anatómiai felépítésű húgyutakkal rendelkező gyermekek között a *HSPA1B* A(1267)G polimorfizmusát illetően, ami arra utal, hogy ezen polimorfizmus hordozása nem a károsító alapbetegsége, jelen esetben a húgyúti malformációra hajlamosít, hanem a húgyutakban csökkent védekező- és regenerálóképességet eredményez.

Összefoglalás-jövőbeli tervek:

Vizsgálataink újabb lépéssel vihetnek közelebb az akut veseelégtelenségben leírt nemi különbségek pathomechanizmusához. Minél pontosabban tárjuk fel a folyamatot, annál célravezetőbben tervezhetjük meg kezelési stratégiánkat. Elképzelhető, hogy a jövőben, tervezett beavatkozások előtt (pl. szívműtétek, vesetranszplantáció) direkt hormonkezelést tudunk alkalmazni, melynek célpontja a *HSP70* család lehet (graft génterápiája, *HSP* gazdag prezervációs folyadék, stb.).

Tekintettel az I/R károsodás jelentőségére a transzplantáció kimenetelében, kísérleteink hozzásegíthetnek új kezelési protokollok, módszerek (nemi hormonok bevezetése, külön kezelési algoritmusok nők és férfiak számára) tervezéséhez, kidolgozásához. Ezek az eredmények nem csupán a transzplantált betegek életkilátásait javíthatják, de jelentősen csökkenthetik az átmeneti vesepótló kezelések szükségességét I/R károsodással járó egyéb esetekben, pl. nyitott szívműtétek, súlyos klinikai állapotok kapcsán is. Bár számos egyéb szempont is felmerül a kezelés kialakításakor, ezek az eredmények újabb adalékkal szolgálhatnak a minél optimálisabb terápiához, javíthatják a betegek életminőségét, csökkenthetik a posztisztkémiás mortalitást és mérsékelhetik az egészségügyi ellátás költségeit.

Klinikai vizsgálataink alapján mérlegelnünk kell a *HSPA1B* és *TLR4* polimorfizmusok klinikai jelentőségét. Adataink igazolják, hogy a *HSPA1B* (1267)G allél hordozása rizikótényezőt jelen UTI, VUR, ezeknek következtében kialakuló heggesedés, és CRF létrejöttére. A *TLR4* (896)G allél hordozása pedig, VUR jelenlététől függetlenül, növeli a UTI lehetőségét. Ha egy gyermek vizsgálata során fény derül ezen polimorfizmusok hordozására, a jövőben felmerülhet bennünk a terápia változtatása, a megelőzés céljából radikálisabb, illetve egyénre szabott kezelési módok választása.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Müller V, Szabo A, Viklicky O, Gaul I, Vogelsang M, Pörtl S, Philipp T, Heemann U: Sex hormones and gender-related differences: Their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* (1999) 55: 2011-2020
2. Müller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay Á, **Fekete A**, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ: Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int* (2002) 62:136471
3. Vannay Á, **Fekete A**, Müller V, Strehlau J, Heninger E, Veres T, Reusz Gy, Tulassay T, Szabó AJ. The effects of histamine and the H2 receptor antagonist ranitidine on ischemia induced acuter renal failure: involvement of IL-6 and vascular endothelial growth factor (VEGF) *Kidney Blood Press Res* (2004) 27:105-113
4. A Vannay, **A Fekete**, Cs Adori, T Toth, Gy Losonczy, L Laszlo, B Vasarhelyi, T Tulassay, A Szabo. Divergence of renal VEGF mRNA expression and protein level in postischemic rat kidneys. *Exp Physiol* (2004) 89: 435-444
5. **Fekete A**, Vannay Á, Vér Á, Vásárhelyi B, Müller V, Reusz Gy, Tulassay T, Szabó AJ. Gender differences in alterations of Na⁺/K⁺-ATPase following ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *J Physiol* (2003) 555:471-80
6. Fink AL: Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* (1999) 79: 425-449
7. Milner CM, Cambell RD: Structure and function of the tree MHX-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* (1990) 32: 242-251
8. Schober A, Müller E, Thureau K, Beck FX: The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischaemia in different kidney zones. *Eur J Physiol* (1997) 434: 292-299
9. Vicencio A Bidmon B, Ryu J, Reidy K, Thulin G, Mann A, Gaudio KM, Kashgarian M, Siegel NJ: Developmental expression of HSP-72 and ischemic tolerance of the immature kidney. *Pediatr Nephrol* (2003) 18: 85-91
10. Aufricht C, Bidmon B, Ruffingshofer D, Regele H, Herkner K, Siegel NJ, Kashgarian M, Van Why SK: Ischemic conditioning prevents Na,K-ATPase dissociation from cytoskeletal cellular fraction after repeat renal ischemia in rats. *Pediatr Res* (2002) 51: 722-727
11. **A Fekete**, Á Vannay, Á Vér, K Rusai, V Müller, Gy Reusz, T Tulassay, A J Szabó. Gender differences in heat shock protein 72 expression and localisation following renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* published online, 2006
12. Ziemienowicz A, Zylicz M, Floth C, Hubscher U: Calf thymus Hsc 70 protein protects and reactivates prokaryotic and eukaryotic enzymes. *J Biol Chem* (1995) 270:15479-5484
13. Van Why SK, Siegel NJ: Heat shock proteins in renal injury and recovery. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (1998) 7:407-412
14. Pociot F, Roningen KS, Nerup J: Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* (1994) 38:491-495
15. Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L: Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* (2001) 91:672-678
16. Plumier JC, Currie RW: Heat shock-induced myocardial protection against ischemic injury: a role for Hsp70? *Cell Stress Chaperones* (1996) 1:13-17
17. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE Lowry SF: Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of Gram-negative infections. *J Inf Dis* 2002. 186:1522-1525.
18. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* (2000) 25: 187-191
19. **Fekete A**, Treszl A, Tóth-Heyn P, Vannay A, Tordai A, Tulassay T, Vasarhelyi B: Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. *Pediatr Res* (2003) 54:452-456
20. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjale H, Svanborg C: Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* (2004) 72: 3179-3186
21. Beck FX, Neuhofer W, Müller E: Molecular chaperons in the kidney: distribution, putative roles and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* (2000) 279:F203-F215
22. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science* (2002) 296: 298-302
23. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis F. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* (2003) 111: 1571-1578
24. Michel O, LeVan TD, Stern D, et al. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J Allergy Clin Immunol* (2003) 112: 923-927
25. Palmer SM, Burch LH, Davis DR, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Resp Crit Care Med* (2003) 168: 628-635
26. Bradley A Warady, Vimal Chadha: Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol* (2007) 22:1999-2009
27. Broyer M, Chantler C, Donckerwolcke R, Ehrlich JH, Rizzoni G, Sharer K: The pediatric registry of the European Dialysis and Transplant Association: 20 years' experience. *Pediatr Nephrol* (1993) 7:758-768
28. **Fekete A**, Karoly E, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, Szabo AJ, Tulassay T, Reusz GS. Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res*, (2007) 61: 371-374
29. Chassin C, Goujon JM, Darche S, du Merle L, Bens M, Cluzeaud F, Werts C, Ogier-Denis E, Le Bouguenec C, Buzoni-Gater D, Vandewalle A.: Renal collecting duct epithelial cells react to pyelonephritis-associated Escherichia coli by activating distinct TLR4-dependent and - independent inflammatory pathways. *J Immuno.* (2006) 177:4773-4784
30. Campisi J, Fleschner M: Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *J Appl Physiol* (2003) 94:43-52