

2012.
LXXXVII.
évfolyam,
1. szám

ORVOS- KÉPZÉS



PhD Tudományos Napok 2012

- ▶ **Gyógyszertervezés:** helyzetkép és kihívások
- ▶ **Hepatocarcinogenesis** matrilin-2-hiányos egerekben
- ▶ A **komplementparaméterek** előre jelzik a C1-inhibitor hiányában kialakuló **hereditaer angiooedema** súlyosságát
- ▶ **Nagyér-transzpozícióban** az arteria carotis csökkent rugalmassága nem rontja a **cardiovascularis autonóm funkciót**
- ▶ A **reninszkréció vizsgálata** multifoton-mikroszkóppal a **vese** akut és krónikus kórfolyamataiban



FELELŐS SZERKESZTŐ

Merkely Béla
merkely.bela@kardio.sote.hu

FŐSZERKESZTŐK

Gál János
janos.gal67@gmail.com

Langer Róbert
roblanger@hotmail.com

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG

Graduális képzés

Matolcsy András
matolcsy@korb1.sote.hu

PhD-képzés

Szél Ágoston
szel@ana2.sote.hu

Szakorvos-továbbképzés

Szathmári Miklós
szatmik@bel1.sote.hu

Rezidens- és szakorvosképzés

Préda István
predadr@gmail.com

Tagok

Ádám Veronika, Bereczki Dániel, Bitter István, Csermely Péter, de Châtel Rudolf, Dobozy Attila, Eckhardt Sándor, Édes István, Fazekas Árpád, Fejérdy Pál, Fekete György, Halász Béla, Karádi István, Kárpáti Sarolta, Kásler Miklós, Keller Éva, Kollai Márk, Kopper László, Ligeti Erzsébet, Losonczy György, Magyar Kálmán, Mandl József, Muszbek László, Nagy Károly, Nardai Sándor, Nemes Attila, Németh János, Noszál Béla, Palkovits Miklós, Papp Gyula, Papp Zoltán, Petrányi Győző, Répássy Gábor, Rigó János, Réthelyi Miklós, Romics Imre, Rosivall László, Sótonyi Péter, Szendrői Miklós, Szirmai Imre, Szollár Lajos, Telegdy Gyula, Tompa Anna, Tóth Miklós, Tulassay Zsolt, Tulassay Tivadar, Vasas Livia, Vincze Zoltán, Zelles Tivadar

Szerkesztőségi titkár

Szelid Zsolt
orvoskepzes@kardio.sote.hu

Az ORVOSKÉPZÉS megjelenik negyedévente. Megrendelhető a Kiadótól.

Szerzői jog és másolás: minden jog fenntartva. A folyóiratban valamennyi írásos és képi anyag közlési joga a szerkesztőségé. A megjelent anyag, illetve annak egy részének bármilyen formában történő másolása, ismételt megjelentetéséhez a szerkesztőség hozzájárulása szükséges.

ORVOSKÉPZÉS

A graduális és posztgraduális képzés folyóirata
Alapítva 1911-ben
2012; LXXXVII. évfolyam, 1:1-40.

Orvosképzés Szerkesztőség:
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

Kiadja és terjeszti:

Semmelweis Kiadó
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

Telefon: 210-4403

Fax: 210-0914, 459-1500/56471

Internet honlap:

www.semmelweiskiado.hu

E-mail: info@semmelweiskiado.hu
orvoskepzes@semmelweiskiado.hu

Szerkesztő:

VINCZE JUDIT
vincze.judit@mail.datanet.hu

Illusztráció:

ÁNGYÁN GERGŐ

Kiadásért felel:

TÁNCOS LÁSZLÓ
tancos@mail.datanet.hu

Hirdetésszervező:

KOVÁCS VERONIKA
Telefon: 215-1401, 06 20/ 221-5265
kovver@net.sote.hu

Nyomdai előállítás:

Avaloni Kft.

ISSN 0030-6037



Semmelweis Kiadó
www.semmelweiskiado.hu



ORVOSKÉPZÉS

A graduális és posztgraduális képzés folyóirata alapítva 1911-ben 2012; LXXXVII. évfolyam, 1:1-40.

Az
ORVOSKÉPZÉS
folyóirat
megrendelhető:
orvoskepzes@semmelweiskiado.hu

E-ORVOSKÉPZÉS
Töltse le a folyóiratot a
www.semmelweiskiado.hu
oldaláról!

Tartalom / Contents

Rácz Károly	Előszó	3
Mátyus Péter	Gyógyszertervezés: helyzetkép és kihívások <i>Drug Design: current status and challenges</i>	5
Fullár Alexandra Baghy Kornélia Deák Ferenc Kiss Ibolya Kovalszky Ilona	Hepatocarcinogenesis matrilin-2-hiányos egerekben <i>Hepatocarcinogenesis in matrilin-2 knock out mice</i>	9
Csuka Dorottya Varga Lilian Füst György Prohászka Zoltán Farkas Henriette	A komplementparaméterek előre jelzik a C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditaer angiooedema súlyosságát <i>Complement pathway parameters predict disease severity in hereditary angioedema</i>	21
Pintér Alexandra Horváth Tamás Kádár Krisztina Kollai Márk	Nagyér-transzpozícióban az arteria carotis csökkent rugalmassága nem rontja a cardiovascularis autonóm funkciót <i>Reduced carotid artery distensibility does not impair cardiac autonomic function in patients with transposition of the great arteries</i>	29
Prókai Ágnes Himer Leonóra Berta Nóra Kosik Anna Vannay Ádám Kis-Petik Katalin Szabó J Attila	A reninszekréció vizsgálata multifoton-mikroszkóppal a vese akut és krónikus kórfolyamataiban <i>Experimental studies on renin secretion in acute and chronic renal diseases using multiphoton microscopy</i>	35

A kiadvány megjelenését a

TÁMOP-4.2.3/08/1/KMR-2008-0003

Semmelweis Egyetem Piramis Projekt támogatta



Semmelweis Egyetem
PIRAMIS PROJEKT
Tudományi Innovációk és Kompetenciák
a Képzésben



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



MAGYARORSZÁG MEGÚJUL



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



DR. RÁCZ KÁROLY
egyetemi tanár

Előszó

Az Orvosképzés folyóirat e lapszáma a Semmelweis Egyetem 2012. évi PhD Tudományos Napok alkalmából jelenik meg. Az évente megrendezett PhD Tudományos Napok a Semmelweis Egyetem nyolc Doktori Iskolájában tanulmányokat folytató hallgatók és doktorjelöltek kiemelkedő tudományos fórumává vált. Vonzó jelentőségét az idei évben is a program iránti érdeklődés, az előadások és poszterbemutatók nagy száma jelzi. Túlzás nélkül mondható, hogy a résztvevők az idei rendezvényen is a tudományos munka multidiszciplináris seregszemléjének részesei lehetnek, hiszen az Egyetem különböző tudományos műhelyeiben tevékenykedő PhD-hallgatók és doktorjelöltek beszámolóin keresztül a tudományterületek és tudományágak sokasága jelenik meg. A Semmelweis Egyetem Doktori Iskoláinak hallgatóin kívül az előadók sorában az idei évben is örömmel üdvözljük több hazai és külföldi egyetem PhD-hallgatóit.

A lapszámban megjelenő első két dolgozat szerzői a Semmelweis Egyetem „Kiváló PhD Oktatója” díjjal kitüntetéssel elismert *Mátyus Péter* professzor és *Kovalszky Ilona* professzor asszony. A tudományos kutatás és oktatás e két kimagasló személyiségének munkássága, tudományos és oktatói elkötelezettsége példaképpül szolgál a tudományos életpályájukat éppen megkezdő fiatalok számára. A lapszámban megjelenő többi közlemény a Semmelweis Egyetem Doktori Iskoláiban kiemelkedően eredményes PhD- hallgatók kutatási eredményeit mutatja be.

Bizonyos vagyok abban, hogy a lapszámban megjelenő dolgozatok hasznos betekintést adnak a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájában folyó tudományos munkába.

Budapest, 2012 áprilisában

Dr. Rácz Károly
egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem Doktori Tanács elnöke

Semmelweis Egyetem, PhD Tudományos Napok

2012. április 12-13.

Semmelweis Egyetem, NET, Nagyváradi tér 4.

A Semmelweis Egyetem Doktori Iskolája 2012. április 12-13-án rendezi meg kétnapos konferenciáját a Semmelweis Egyetem Nagyváradi téri Elméleti Tömbben. A rendezvény legfontosabb célja, hogy országos fórumot teremtsen a biomedicinális területen tevékenykedő doktoranduszok számára munkájuk, eredményeik bemutatására, ezen keresztül a tudományos kapcsolatok, együttműködések fejlesztésére.

A Semmelweis Egyetem és a Doktori Iskola nevében minden érdeklődőt sok szeretettel várunk!

TUDOMÁNYOS PROGRAM

2012. április 12. csütörtök

08.30–08.50	Megnyitó: <i>Dr. Tulassay Tivadar</i> egyetemi tanár, a Semmelweis Egyetem rektora <i>Dr. Rácz Károly</i> egyetemi tanár, a Semmelweis Egyetem Doktori Tanácsának elnöke
08.50–09.20	2011. évi „Hugonnai Vilma Díjas” előadó: <i>Dr. Zelkó Romána</i> egyetemi tanár A pozitron annihilation élettartam spektroszkópia gyógyszerészeti alkalmazásának lehetőségei
09.20–9.50	2011. évi „Hugonnai Vilma Díjas” előadó: <i>Dr. Müller Veronika</i> egyetemi docens Celluláris stressz pulmonológiai kórállapotokban
09.50–10.20	<i>Kávészünet</i>
10.20–11.50	Előadások: E-I/1 – E-I/9
11.50–13.00	Előadások: E-II/1 – E-II/7
11.30–13.00	Posztterek: P-I/1 – P-I/7
13.00–14.00	<i>Ebédészünet</i>
14.00–16.40	Előadások: E-III/1 – E-III/16
14.00–15.00	Posztterek: P-II/1 – P-II/5
15.10–15.40	<i>Kávészünet</i>
15.40–17.00	Posztterek: P-III/1 – P-III/8
16.40–18.50	Előadások: E-IV/1 – E-IV/13

2012. április 13.

08.00–09.10	Előadások: E-V/1 – E-V/7
09.10–11.20	Előadások: E-VI/1 – E-VI/13
09.30–10.30	Posztterek: P-IV/1 – P-IV/6
10.30–11.00	<i>Kávészünet</i>
11.20–13.00	Előadások: E-VII/1 – E-VII/10
11.30–13.00	Posztterek: P-V/1 – P-V/8
13.00–14.00	<i>Ebédészünet</i>
14.00–15.50	Előadások: E-VIII/1 – E-VIII/11
14.00–15.00	Posztterek: P-VI/1 – P-VI/6
15.30–16.00	<i>Kávészünet</i>
15.50–17.40	Előadások: E-IX/1 – E-IX/11
16.00–17.00	Posztterek: P-VII/1 – P-VII/6
18.00–18.30	<i>Zárszó, díjkiosztó</i>

Gyógyszertervezés: helyzetkép és kihívások

Drug Design: current status and challenges

ÖSSZEFOGLALÁS A számítógépes hatóanyag-tervezés egyre bővülő és teljesítményében hatékonyabb eszköztárával a mai gyógyszer-innováció esszenciális elemévé vált. A molekuladinamikai számítások új lehetőségeinek implementálásával a jövő új típusú gyógyszereinek racionális tervezésére is lehetőség nyílik.

KULCSSZAVAK gyógyszer-innováció, racionális hatóanyag-tervezés, dokkolás, farmakofor, QSAR

SUMMARY Computational drug design with its increasing performance and efficient methods has become an essential tool for current pharmaceutical innovation. Implementation of conceptually novel molecular dynamics may lead to a rational basis for designing of new types of pharmaceuticals.

KEY WORDS pharmaceutical innovation, rational drug design, docking, pharmacophore, QSAR

Mátyus Péter

Semmelweis Egyetem,
Szerves Vegytani Intézet

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Mátyus Péter
egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem, Gyógyszer-
résztudományi Kar
Szerves Vegytani Intézet
1092 Budapest, Hógyes Endre u. 7.

E-mail:

matyus.peter@
pharma.semmelweis-univ.hu

A gyógyszer-innováció komplex, tipikusan multidiszciplináris, költséges és hosszan tartó folyamat. Az elmúlt két évtizedben a kutatás-fejlesztés (K+F) teljes időtartama szinte alig változott, jóllehet a költségek meredeken emelkedtek, a produktivitás (az eredeti kismolekulás gyógyszerkészítmények száma) viszont csökkent, s az utóbbi években szerény szinten változatlan. Az amerikai gyógyszer-engedélyezési hatóság (FDA) által jóváhagyott új kismolekulák száma 20 körül, a biológiai készítményeké 4 körül van évek óta, messze alulmúlva azt a várakozást, amit például a humán genom projektől reméltek. Napjainkban egy új készítmény piacra juttatása kb. 1,5 milliárd USD-ba kerül, és az innováció 10-14 évig tart. A gyógyszeripari K+F hatalmas költségei ma (is) abból (is) erednek, hogy a preklinikai szakasz végén (4-6 év) kiválasztott gyógyszerjelöltek nem csekély számú hányada hullik ki a 6-8 évig tartó, költséges klinikai és törzskönyvezési szakasz második felében. Meglepő módon, a magas sikertelenségi ráta döntő okai a jelöltek nem kellő hatásossága és/vagy toxicitása (ideértve a kedvezőtlen mellékhatásokat is). Miből eredhetnek ezek az okok? Vajon a biológiai, gyógyszerkémi és/vagy klinikai ismereteink hiányosságai vagy a választott K+F módszerek (inherens) korlátai a felelősök a helyzetért? Nem ismert még a pontos válasz és a megoldás sem, bár a gyógyszeripar jelentős erőfeszítéseket tesz: új kutatási stratégiák kidolgozásától, új kutatási és fejlesztési módszerek alkalmazásán át, új üzleti modell kialakításáig, remélve az eredményesség hosszú távú javítását.

A szűk korlátok között nem vállalkozhatunk részletes elemzésre az okokat illetően, csupán utalásszerűen említhetünk néhány fontosnak tartott szempontot. Egyik kulcsfeladatnak tekinthető a biológiai célpont körütekintőbb mérlegelése és a gyógyszerjelölt kívánt tulajdonságainak definiálása. Ezekbe, de a preklinikai szakasz egészébe a klinikus bevonása nélkülözhetetlen, különösen ami a gyógyszer molekuláris támadáspontjának betegségrelevanciáját, klinikai szemléletű analizisét és releváns biomarkerek megválasztását, akár újak azonosítását illeti. Másrészt, ugyanígy fontos a gyógyszerkémikus és farmakológus részvétele a klinikai szakaszban, a megfigyelések mechanizmusalapú, molekuláris értelmezéséhez.

Míndez biológus – gyógyszerkémikus – farmakológus – farmakokinetikai szakértő – gyógyszertechnológus – klinikus szoros együttműködését, az egymás területeire vonatkozó alapismeretek birtokában a „beszélő viszonyt”, a problémák komplex megközelítését, egymás számára kérdések feltevését és a specifikus válaszok általánosabb értelmezését teszi szükségessé, illetve lehetővé. Nem kétséges az sem, hogy a PhD-képzésnek e szempontokat szintén figyelembe kell vennie a jövő tudósainak multi- és interdiszciplináris szemléletű képzésével.

Míndez alapján reméljük, hogy a tárgyalásra kerülő hatóanyag-tervezési szempontok és módszerek a gyógyszerkutatás iránt érdeklődést mutató többféle szakterület szakembereinek figyelmére is számíthatnak.

Köszönetnyilvánítás

E területtel kapcsolatos saját munkáink egy részének pénzügyi hátterét a TÁMOP -4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0001 projekt biztosítja, melyért ezúton mondunk köszönetet.

A gyógyszerjelölt molekula egy sereg optimális tulajdonsággal kell, hogy rendelkezzen: többek között a farmakológiai célhatással (szelektíven), ADMET (abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkréció, toxicitás) szempontjából megfelelő fizikokémiai tulajdonságokkal.

A célhatás tehát csak egy követelmény; a gyógyszerjelölté válás útja a vezérvegyülettől („lead”) multidimenziós optimalizálási folyamatot jelent. Nem kétséges azonban, hogy a gyógyszerek a kiszemelt biológiai makromolekulával (receptor/enzim) való produktív kölcsönhatása, amely a kívánt farmakológiai hatást eredményezheti, nélkülözhetetlen tulajdonságot jelent. Ennek tervezhetősége tehát kétségtelenül nagyon fontos. A klasszikus experimentális alapú, a mért biológiai hatás alapján történő „trial-and-error” megközelítés, nemritkán váratlan felismerések révén, a gyógyszerkémikus intuitív-kreatív érzékével folytatott molekulamódosítások sorozatával vezetett a gyógyszerjelölthöz. Ezt az utat bizonytalanságai és hatékonyságának korlátai miatt kétségkívül érheti kritika. De van-e biztosabb, gyorsabb, gazdaságosabb alternatíva? A feladat nehézségét illusztráló, elegendő két kihívást említeni. Az első a molekulák körének hatalmas gazdagsága és változatossága, a kémiai lehetséges molekulák száma (10^{60} – 10^{100}) elképesztő, messze meghaladja a csillagok számát (1, 2), és nem túlzás azt állítani, hogy a tűt a szénakazalban talán könnyebb megtalálni, mint e körből a gyógyszerjelöltet. Csoda-e, hogy az akár sokszázezer, a lehetséges molekulakörnek azonban még mindig csak elenyésző töredékét reprezentáló molekula tesztelése „high-throughput-screening” (HTS) módszerekkel nem forradalmasította a gyógyszerkutatást? Jogos kérdés, hogy miért nem fókuszálunk e helyett a receptor–ligandum kölcsönhatás leírására, kiválasztva a legtokéletesebben illeszkedő (energetikailag optimális kölcsönhatásra képes) molekulát, ezzel feleslegessé téve a vegyület-százezrek szintézisét és experimentális szűrését. Ennek a módszernek azonban szintén van inherens problémája. Nevezetesen, a fehérje–ligandum tipikusan nemkovalens kölcsönhatását kísérő szabadentalpia-változás mindössze 10–12 kcal/mol nagyságú értéke; kb. 1 kcal/mol abszolút pontossággal kellene számítani a kölcsönhatási energiát, mely elvi és gyakorlati nehézséget jelent.

A racionális molekulatervezés mai eszközrendszere, legalábbis részben, választ tud adni e kihívásokra: képes *de novo* tervezni és a szerkezet optimalizálásához érdemi mértékben hozzájárulni. A szintetikus szerves kémia ma hatékony fejeztárval a tervek létező molekulákká konvertálhatók.

A racionális molekulatervezés a számítógépes hatóanyag-tervezés (szakirodalmi megfelelői: computational drug design; computer-aided drug design, rövidítése: CADD; computer-based design of drug (like) molecules) különféle módszereire épít.

Az utóbbi egy-másfél évtizedben [korábbi magyar nyelvű áttekintés (3)] jelentős fejlődés figyelhető meg a területen (4-6), sőt, ma már több gyógyszer-molekuláról, pl. ilyen az imatinib, is meggyőzően állítják, hogy bevezetésükben e molekulatervezési módszerek döntő szerepet kaptak.

A CADD módszer-együttesnek két típusa van:

- a) receptor-alapú (szerkezeti-alapú; „structure-based”),
- b) ligandum-alapú

változat, melyek nemcsak egymással, hanem kémiai informatikai (szakirodalomban: chemical informatics, cheminformatics elnevezéssel az 1990-es végén alakult ki, kémiai adatbázisok informatikai eszközökkel való vizsgálatát jelentő) módszerekkel is összefonódhatnak.

Az első módszer a receptorfehérje szerkezetéből indul ki. Számos fehérje experimentális úton (röntgen-kristallográfiai vagy nmr-spektroszkópiai módszerekkel) meghatározott szerkezete (pontosabban nem molekulaszervezetként, hanem elektronsűrűségi adatok alapján felépíthető szerkezetként) rendelkezésre áll a Protein Data Bank (PDB) gyűjteményben, amelyből, bár nem mindig triviális lépésekkel (vízmolekulák eltávolítása, hidrogénatomok hozzáadása) lehet azt a molekulaszervezetet megkapni, amit a ligandummal való kölcsönhatásának vizsgálatára használunk. Amennyiben a fehérje ligandum-kötőzsebe nem lenne ismert, annak azonosítására is van módszer. Ha kísérleti úton meghatározott szerkezetünk nincs, akkor ún. homológia modellezéssel állíthatjuk elő a háromdimenziós szerkezetet, megfelelő (rokonság és aminosav-szekvencia átfedés alapján választott) templát szerkezettel, majd energiainimalizálással, molekulamechanikai erőteret alkalmazó szoftverrel, pl. az elterjedt MacroModel szoftverrel. Arra is van módszer, kétségkívül sokkal több bizonytalansággal, hogy a primer aminosav-szekvencia alapján építjük fel a szerkezetet. A fehérje szerkezetének „minőség-ellenőrzése” elméleti kémiai megfontolásokkal és megfelelő, pl. PROCHECK, szoftverrel végzett számításokkal lehetséges. A következő lépés kétféle lehet:

- a) *de novo* ligandum tervezéssel a kötőzsebe szerkezete alapján, komplementer szerkezeti elemek egybeépítésével létrehozott molekulákhoz jutunk – erre szintén vannak alkalmas szoftverek;
- b) molekulák dokkolásával és sorrendbe állításukkal (ezzel a módszerrel *in silico* szűrés is végezhető).

A dokkolásos módszer ma akadémiai és ipari kutatóhelyeken egyaránt széles körben rendelkezésre áll, érdemes róla kissé bővebben szólni.

A dokkolás („posing” + „scoring”) során a számítógépes program meghatározza azt az optimális molekulahelyzetet, ahogyan a molekula a receptorhoz illeszkedik és egy empirikus függvénnyel számítja az ehhez tartozó kötési affinitásnak megfelelő vagy legalábbis azzal arányos kölcsönhatási energiát (a függvény általában hidrogénhidas és ionos kölcsönhatásokat, hidrofób és pi-pi kölcsönhatásokat és egy entrópiájárolékot vesz figyelembe). Ez a számítási mód, mely eleve közelítő számítás, behatárolja a kapott adatok megbízhatóságát és minőségét. A dokkolásra gyakran alkalmazott két szoftver az AutoDock (szabadon letölthető az internetről) és Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY) eltérő közelítő függvényt használ, előbbi az AMBER erőteret, utóbbi experimentális úton meghatározott kötési affinitások alapján illesztett függvényt. Saját tapasztalataink szerint is e módszerek utóbbi években bevezetett verzióinak gyorsasága és teljesítőképessége jelentősen javult, s a hasznos információt nyújtó rutin-számítások egy jobb személyi számítógéppel is elvégezhetőek.

A molekulaillesztés merev vagy flexibilis módon történhet. Az utóbbi felel meg a valóság helyzetnek jobban; technikai problémát azonban éppen a konformációs flexibilitás figyelembe vétele jelenti, a nagymértékben megnövekvő számítási igény miatt. A dokkolás predikciós teljesítménye a HTS-étől nem sokban marad el. A dokkolás kiegészíthető molekuladinamika számításokkal is a még pontosabb predikció érdekében. Sőt, a technika még valamilyen *in silico* szűrési (pl. ADMET-tel összefüggő) paraméterrel is bővíthető, ésszerűen szűkítve a szintézisre/tesztelésre kiválasztott jelöltek körét.

Amennyiben nem áll rendelkezésre megfelelő minőségű fehérjeszerkezet, a racionális hatóanyag-tervezésnek másik

módszercsaládjá, a ligandumalapú tervezés alkalmazható. Ez esetben szükségünk van experimentális adatokra is. A biológiai hatás és szerkezet korrelációját megállapítva, vizsgálatra még nem került molekulák hatása is előre jelezhető.

Ákár egyetlen aktív molekula szerkezete alapján, kémiai hasonlósági kritériumokkal is kereshető várhatóan aktív analógja.

A farmakofor módszer szintén alkalmazható *in silico* szűrésre. A farmakofor a hatáshoz szükséges szerkezeti elemek azonosítását és geometriai elrendezésük definiálását jelenti. Meghatározásához néhány aktív ligandumra van szükség. E területen szintén eredményes fejlesztések történtek, különösen a receptor–ligandum komplexek alapján energia-optimalizált (7) vagy kristályszerkezetek alapján definiált farmakoforral végzett *in silico* szűrés eredményessége biztató; pl. a Phase (Schrödinger) vagy LigandScout (IntelLigand GmbH) (8) szoftverekkel saját tapasztalataink is meggyőzőek. Érdekes azt is megemlíteni, hogy a ma egyre jobban terjedő több támadáspontú hatóanyagok tervezését, illetve adatbázisok e célból való *in silico* szűrését a megfelelő farmakoforok ismerete hatékonyan támogathatja. Korai példaként említhetők több támadáspontú antiarrhythmiai vegyületekkel kapcsolatos saját munkáink (9), míg egy újabb kitűnő összefoglaló a legújabb módszereket ismerteti (10).

Kvantitatív biológiai adat becslésére képesek a QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) modellek. Ezekhez általában legalább 20 vegyületre van szükség. Főként háromdimenziós változataikat használják elterjedten. Az 1990-es években elterjedt CoMFA (Cooperative Molecular Field Analysis) módszer mellett hasonló filozófiájú technikák is ismertek. A ligandumok sztérikus és elektrosztatikus leírói és a biológiai aktivitás között, konvencionális módszerek esetén, lineáris kvantitatív kapcsolatot (folytonos QSAR) tételezünk fel, mely rendszerint csupán rokon struktúrákra érvényes, következésképpen a becslés is ilyen molekulákra lesz jobb. A nem lineáris módszerek hatékonyabban alkalmazhatók nem homológ sorozatokra is (11). A háromdimenziós QSAR módszerek esetében a számításokhoz a molekulákat egy-

másra kell helyezni ahhoz, hogy a hatáskülönbséget okozó szerkezeti különbségeket pontosan értelmezzük. Ehhez ismerni kellene azonban az egyes molekulák bioaktív konformerét, amely rendszerint nem áll rendelkezésre. A felhasználó intuitív képessége és gyakorlata jelentős szerepet játszhat az eredményességben.

Ez a megállapítás akár a számítógépes hatóanyag-tervezés többi módszerére is vonatkoztatható. Nincs csodafegyverünk. Az utóbbi évtizedben bevezetett új módszerek eredményesebben használhatók, ez azonban nem annyira a nagyobb számítógép teljesítménynek, hanem ötletes megoldásoknak köszönhető. Ha a modellező ismeri az alkalmazott metodikák teljesítőképességét elvi korlátaikkal együtt és képes azokat nemcsak sematikus, hanem kreatív módon, inspiráló eszközként használni, úgy hatékony támogatást remélhet a molekulák tervezéséhez.

Mi újat hozhat a jövő a számítógépes molekulatervezés területén? Nagy előrelépést jelenthet a makromolekulák konformációs (és kölcsönhatásai) vizsgálatában az új filozófiájú molekuladinamikai számítások alkalmazása és azokat lehetővé tevő hardver fejlesztés. Ez áttörést hozhat a bioaktív konformerek meghatározásában, sőt, várhatóan a következő évtizedek gyógyszerkincsének jelentősebb hányadát képviselő fehérje–fehérje kölcsönhatások befolyásolására képes kismolekulák tervezésében.

Mindemellett, a gyógyszerkincset szintén gyarapítani képes, a meglévő gyógyszerkincs önmagában vagy kombinációban történő hasznosítása új hatásterületen egyszerűbb, gyorsabb és biztonságosabb fejlesztést jelenthet. Ezen a területen újabb számítógépes támogatást is hasznosító gyógyszerkeresési stratégiák is kezdenek kialakulni. Saját tapasztalataink is utalnak arra, hogy e célból a számítógépes hatóanyag-tervezési módszerek hatékonyan kombinálhatók a bioinformatika eszközeivel.

A gyógyszerkutató számára bőven lesznek tehát izgalmas új kihívások a következő évtizedekben is.

Irodalom

1. Dobson CM: *Chemical space and biology*. *Nature* 2004; 432:824-828.
2. Lipinski C, Hopkins A: *Navigating chemical space for biology and medicine*. *Nature* 2004; 432:855-861.
3. Mátyus P, Borosy AP: *Három dimenziós szerkezet-hatás összefüggések*. *Acta Pharm Hung* 1998; 68:33-38.
4. Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE: *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. *Med Res Rev* 2006; 26:531-568.
5. Van Drie JH: *Computer-aided drug design: the next 20 years*. *J Comput Aided Mol Des* 2007; 21:591-601.
6. Young DC: *Computational Drug Design: A Guide for Computational and Medicinal Chemists*, Wiley, 2009.
7. Yoo J, Medina-Franco JL: *Homology modeling, docking and structure-based pharmacophore of inhibitors of DNA methyltransferase*. *J Comput Aided Mol Des* 2011; 25:555-567.
8. Wolber G, Seidel T, Bendix F, Langer T: *Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design*. *Drug Discov Today* 2008; 13:23-29.
9. Mátyus P, Rettégi T, Varró A, Papp JGy: *New antiarrhythmic agents: A conceptually novel approach*. *Med Res Rev* 2000; 20:294-303; Backó I, El-Reyani NE, Farkas A, Virág L, Iost N, Leprán I, Mátyus P, Varró A, Papp JGy: *Antiarrhythmic and electrophysiological effects of GYKI-16638, a novel N-(phenoxyalkyl)-N-phenylalkylamine, in rabbits*. *Eur J Pharm* 2000; 404:181-190; Kövesdi I, Dominguez-Rodríguez MF, Órfi L, Náray-Szabó G, Varró A, Papp JGy, Mátyus P: *Application of neural networks in structure-activity relationships*. *Med Res Rev* 1999; 19:249-268.
10. MA XH, Shi Z, Tan C, Jiang Y, Go ML, Low BC, CHEM YZ: *In-silico approaches to multi-target drug discovery: computer aided multi-target drug design, multi-target virtual screening*. *Pharm Res* 2010; 27:739-749.
11. Peltason L, Bajorath J: *Systematic computational analysis of structure-activity relationships: concepts, challenges and recent advances*. *Future Med Chem* 2009; 1:451-466.



ORVOSKÉPZÉS folyóirat szerzői útmutatója

A folyóirat célja: Az 1911-óta megjelenő Orvostudomány legfontosabb célja a hazai orvostudomány folyamatos graduális és posztgraduális képzésének támogatása. A lap elsősorban olyan munkák közlését tartja feladatának, amelyek az orvostudomány egy-egy ágának újabb és leszűrt eredményeit foglalják össze magas színvonalon úgy, hogy azok a gyakorló orvoshoz, szakorvoshoz, klinikushoz és elméleti orvoshoz egyaránt szóljanak. Emellett lehetőség van eredeti közlemények és esetismertetések benyújtására, és az újság a Semmelweis Egyetem szakmai kötelező szinten tartó tanfolyamok előadási összefoglalóinak is teret ad. Az eredeti közlemények a rendszeres lapszámokban, vagy a témához kapcsolódó tematikus lapszámokban kapnak helyet. Fontos feladatunknak tartjuk, hogy rezidens kollégák tollából származó esetismertetések is közöljünk, melyeket mentori ajánlással kérünk benyújtani. A beadott dolgozatokat a szerkesztőbizottság előzetes bírálatra adja ki, és a kézirat közlésére a bírálat eredményének függvényében kerül sor. Tudományos dolgozat benyújtására az alábbiak szerint van lehetőség:

- Esetismertetés (case report)
- Fiatal doktorok (PhD) tudományos beszámolója, új eredményei-ek összefoglalása (nem tézisek vagy doktori értekezések!)
- Klasszikus összefoglaló közlemény az elméleti és klinikai orvostudomány bármely területéről, a legújabb irodalmi eredmények felhasználásával
- „Update” jellegű közlemény, azaz nem egy téma kidolgozása, hanem adott szakterület legújabb tudományos eredményeinek összefoglalása
- Előadási összefoglaló (a tanfolyamszervezők felkérése alapján)

A kézirat: A tudományos közleményeket elektronikusan, Word dokumentum formátumban kérjük eljuttatni a szerkesztőségbe. Az illusztrációkat, ábrákat és táblázatokat külön file-ként kérjük elküldeni. Az ábrák címeit és az ábramagyarázatokat a Word dokumentumban külön oldalon kell feltüntetni, az ábra/táblázat számának egyértelmű megjelölésével. A digitális képet minimum 300 dpi felbontásban kérjük, elfogadjuk tif, eps, illetve cdr kiterjesztésű file-okat. A kézirat elfogadása esetén az ábrákat a szerkesztőség nyomtatott formában is kéri elküldeni. Az orvosi szavak helyesírásában az Akadémia állásfoglalásának megfelelően, a latin írásmód következetes alkalmazását tekintjük elfogadottnak. Magyarosan kérjük írni a tudományágak és szakterületek, a technikai eljárások, műszerek, a kémiai vegyületek neveit. A szerkesztők fenntartják maguknak a stiláris javítás jogát. A mértékegységeket SI mértérendszerben kérjük megadni.

A kézirat felépítése a következő: (1) címlap, (2) magyar összefoglalás, kulcsszavakkal, (3) angol összefoglalás (angol címmel), angol kulcsszavakkal, (sorrendben): magyar cím, angol cím, (4) rövidítések jegyzéke (ha van), (5) szöveg, (6) irodalomjegyzék, (7) ábrajegyzék, (8) táblázatok, (9) ábrák. Az oldalszámozást a címlaptól kezdve kell megadni és az egyes felsorolt tételeket külön lapon kell kezdeni.

(1) A *címlapon* sorrendben a következők szerepeljenek: a kézirat címe, a szerzők neve, valamint a szerzők munkahelye, a kapcsolattartó szerző pontos elektronikus és postai címének megjelölésével. (2–3) Az *összefoglalást* magyar és angol nyelven kell beküldeni, külön oldalon, a következő szerkezet szerint: „Bevezetés” („Introduction”), „Célkitűzés” („Aim”), „Módszer” („Methods”), „Eredmények” („Results”) és „Következtetések” („Conclusions”) lényegre törő megfogalmazása történjen. A magyar és az angol összefoglalások terjedelme – külön-külön – ne haladja meg a 200 szót (kulcsszavak nélkül). A témához kapcsolódó, maximum 5 kulcsszót az összefoglaló oldalán, azokat követően kérjük feltüntetni magyar és angol nyelven. (4) A kéziratban előforduló, nem általános elfogadott *rövidítésekről* külön jegyzéket kell készíteni abc-sorrendben. (5) A szöveg szerkezete világos és az olvasó számára átlátható legyen. Eredeti közlemények esetén a „Bevezető”-ben röviden meg kell jelölni a problémafelvetést, és az irodalmi hivatkozásokat a legújabb eredeti

közleményekre és összefoglalókra kell szűkíteni. A „Módszer” részben világosan és pontosan kell leírni azokat a módszereket, amelyek alapján a közölt eredmények születtek. Korábban közölt módszereket esetén csak a metodika alapelveit kell megjelölni, megfelelő irodalmi hivatkozással. Klinikai vizsgálatoknál a kéziratához csatolni kell az illetékes etikai bizottság állásfoglalását. Állatkísérletek esetén a Magyar Tudományos Akadémia – Egészségügyi Tudományos Tanács – állatkísérletekre vonatkozó etikai kódexe érvényes, melyre a metodikai részben utalni kell. A statisztikai módszereket és azok irodalmát is meg kell adni. Az „Eredmények” és a „Megbeszélés” részeket világosan kell megszerkeszteni. *Referáló közlemények* benyújtása esetén a szövegtörzs altémákra osztható, melyeket alcímek vezessenek be. *Összefoglaló referátumoknál* a szövegtörzs terjedelme ne haladja meg a 30 000 karaktert (szóközzel), *eredeti közleménynél* (klinikai, vagy kísérletes) ne haladja meg a 20 000 karaktert (szóközzel), *esetismertetésnél* ne haladja meg a 10.000 karaktert (szóközzel), *előadási összefoglaló* esetén pedig ne haladja meg a 8000 karaktert (szóközzel).

Irodalom: a hivatkozásokat (maximum 50, előadási összefoglalónál maximum 10) a szövegben való megjelenés sorrendjében tüntessék fel. A szövegben a hivatkozást a sorszáma jelöli.

Hivatkozás cikke: sorrendben: szerzők neve (6 szerző felett et al./és mtsai), cikk címe, folyóirat neve (Index Medicus szerint rövidítve), év; kötetszám:első-utolsó oldal. Példa: 1. Kelly PJ, Eisman JA, Sambrook PN. Interaction of genetic and environmental influences on peak bone density. Osteoporosis Int 1990; 1:56-60. *Hivatkozás könyvfejezetre,* sorrendben: a fejezet szerzői. A fejezet címe. In: szerkesztők (editors). A könyv címe. A kiadás helye, kiadó, megjelenés éve; fejezet első-utolsó oldala. Példa: 2. Delange FM, Ermans AM. Iodide deficiency. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid. 7th ed. Philadelphia, Lipincott-Raven, 1996; 296-316.

Ábrajegyzék: a megjelenés sorrendjében, arab számmal sorszámozva egymás alatt tartalmazza az ábra címét és alatta rövid és lényegre törő ábramagyarázatot

Táblázatok: külön-külön lapokon kérjük, címmel ellátva és arab számmal sorszámozva. Törekedjenek arra, hogy a táblázat könnyen áttekinthető legyen, ne tartalmazzon zavaróan sok adatot.

Ábrák: külön-külön lapokon kérjük. Csak reprodukálható minőségű ábrákat, fényképek küldését kérjük (min. 300 dpi felbontásban), a korábban megjelölt file formátumokban. A kézirat elfogadása esetén a nyomtatott ábrát kérjük beküldeni a szerkesztőségbe és az ábra hátoldalán puha ceruzával kérjük jelölni a szerző nevét, arab számmal az ábra sorszámát és a vertikális irányát.

A formai hiányossággal beküldött kéziratokat nem tudjuk elfogadni. A gyors lektori és korrektúrafordulók érdekében kérjük a legbiztosabb levelezési, illetve e-mail címet, telefon- és faxszámot megadni. Elfogadás esetén külön levélben kérjük jelezni, hogy a szerzők a közleménnyel egyetértenek (és ezt aláírásukkal igazolják), valamint lemondanak a folyóirat javára a kiadási jogról. Írásbeli engedélyt kérünk mellékelni a már közölt adat/ábra felhasználása, felismerhető személy ábrázolása, szerzőnek nem minősülő személy nevének említése/feltüntetése esetén. A szerkesztőség az általa felkért szakértők személyét titkossággal kezeli. A kézirat tulajdonjoga a megjelenésig a szerzőt illeti meg, a megjelenés napján tulajdonjoga a kiadóra száll. A megjelent kéziratok megőrzésére szerkesztőségünk nem tud vállalkozni.

A kéziratok benyújtását a következő címre várjuk:

Dr. Szelid Zsolt szerkesztőségi titkár
Semmelweis Egyetem, Kardiológiai Központ
1122 Budapest, Városmajor u. 68
Tel: (06-1) 458-6810
E-mail: orvoskepzes@kardio.sote.hu

Hepatocarcinogenesis matrilin-2-hiányos egerekben

Hepatocarcinogenesis in matrilin-2 knock out mice

Fullár Alexandra¹
Baghy Kornélia¹
Deák Ferenc²
Kiss Ibolya²
Kovalszky Ilona¹

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés.* A matrilin-2 (Matn2) az extracelluláris mátrix felépítésében (ECM) fontos szerepet játszó kapcsoló fehérje. Funkciója a májban nem ismert.

Célkitűzés. Munkánk a Matn2 hepatocarcinogenesisben betöltött szerepét vad típusú (VT) és matrilin-2-hiányos (*Matn2*^{-/-}), dietil-nitrozámmal (DEN) kezelt egérmoldellen kívánta tisztázni.

Módszer. A májszövetet makroszkóposan, szövettanilag és immunhisztokémiával is vizsgáltuk. A génexpressziós változásokat mRNS-szinten real-time polimeráz láncreakcióval, fehérjeszinten macroarray-vel és western blottal határoztuk meg.

Eredmények. A VT állatokkal összehasonlítva a *Matn2*^{-/-} egerek mája érzékenyebbé vált a karcinogén folyamatokkal szemben, bennük DEN nélkül is megindult a tumorképződés. A DEN kezelést követően a *Matn2*^{-/-} májokban a vadakhoz képest sokkal több és nagyobb tumor keletkezett. Matrilin-2 hiányában az EGFR, ERK1/2, aktiválódását GSK-3 α / β és retinoblastoma fehérje inaktiválódását, a p21/CIP1 mennyiségének csökkenését, valamint a β -katenin mennyiségének növekedését figyeltük meg. A vad mintákban fellelhető Ki-67-pozitív tumorsejtcsoportok megerősítették, hogy a Matn2 hiányában a májsejtek proliferációs készsége fokozódik, ami fogékonyá teszi a szövetet a daganatok kialakulása iránt. Ez a felfokozott proliferációs hajlam tovább növekedett a DEN kezelt *Matn2*^{-/-} tumorgócokban.

Következtetések. Munkánk a Matn2 hepatocarcinogenesisben betöltött tumorszuppresszor szerepére és arra hívja fel a figyelmet, hogy ebben a folyamatban az EGFR aktiválódásán keresztül stratégiaailag fontos szerepet játszik az ERK1/2 aktiválódása és a GSK-3 β inaktiválódása.

KULCSSZAVAK Matn2, hepatocarcinogenesis, p-EGFR, ERK1/2 jelátvitel, GSK-3 α / β

SUMMARY *Introduction:* Matrilin-2 (Matn2) is an adaptor protein, playing a role in the assembly of extracellular matrix (ECM). Its function in the liver is not known.

Aim: The impact of Matn2 on hepatocarcinogenesis was investigated in *Matn2*^{-/-} mice comparing them with wild-type (WT) mice in a diethylnitrosamine (DEN) -model.

Methods: The liver tissue was studied macroscopically, histologically and immunohistochemically, gene expression changes were investigated at mRNA level by real-time PCR, at protein level by macro array and western blot.

Results: *Matn2*^{-/-} mice exhibited higher susceptibility for hepatocarcinogenesis compared to wild-type (WT) mice. In their liver spontaneous microscopic tumor foci developed. After DEN treatment the liver of *Matn2*^{-/-} mice contained visible tumors larger both in number and size than that in WT liver. Differing from WT liver spontaneous phosphorylation of EGFR, p44/42 (ERK1/2), GSK-3 α / β and retinoblastoma protein (p-Rb), decrease in p21/CIP1 level and increase in β -catenin protein expression was detected. Focal Ki-67 positivity of these samples provided further support for our presumption, that the lack of Matn2 set the livers into a pro-proliferatory state, making them prone for tumor development. This enhanced proliferative capacity was further increased in the tumor nodules of DEN-treated *Matn2*^{-/-} livers.

Conclusion. Our study suggests that Matn2 functions as a tumor suppressor in hepatocarcinogenesis, and in this process EGFR activation together with that of ERK1/2 as well as inactivation of GSK-3 β are playing strategic role.

KEY WORDS Matn2, hepatocarcinogenesis, p-EGFR, ERK1/2 signaling, GSK-3 α / β

¹Semmelweis Egyetem,

I. Sz. Patológiai és Kísérleti

Rákkutató Intézet

²Magyar Tudományos Akadémia,

Szegedi Biológiai Központ,

Biokémiai Intézet

LEVELEZÉSI CÍM:

Prof. Dr. Kovalszky Ilona

I. Sz. Patológiai és Kísérleti

Rákkutató Intézet

1085 Budapest, Üllői út 26.

E-mail:

koval@korb1.sote.hu

Bevezetés

A matrilinok nem kollagén típusú glikoproteinek, melyek szerepet játszanak az extracelluláris mátrix (ECM) szervezésében (1). Előfordulhatnak homo-oligomerekként és filamentáris hálózatként, ami összekapcsolja a különböző típusú kollagénrostokat. Mivel a matrilinok a von Willebrand-faktor A egységeiken keresztül különböző mátrixkomponensekhez, így proteoglikánokhoz és kollagénekhez tudnak kapcsolódni, funkcionális hidat képeznek, és összeszerelő funkciót töltenek be különböző típusú szövetek extracelluláris mátrixában (2). A matrilin család négy tagot számlál (matrilin-1, -2, -3, -4). A matrilin-2 (Matn2) a család méretben legnagyobb tagja, monomer molekula, tömege minimum 104 300 Da (3), melyet egy 100 kb nagyságú gén kódol, és két promoterről íródik át (4). A monomer forma két von Willebrand-faktor A szerű (vWFA) modulból áll, melyek közrefogják a 10 egységből álló epidermalis növekedési faktor- (EGF-) szerű elemeket, majd mindezt egy egyedi szekvenciájú és egy colided-coil struktúra követi (3). A colided-coil egységnek köszönhetően a Matn2 oligomereket képes alkotni; szövetkivonatokban és sejt kultúra felülszobában monomer, dimer, trimer és tetramer formák keveréke mutatható ki (5). Képes kötődni a kollagénrostokhoz, fibronektinhez és a laminin-nidogen-1 komplexhez (6). *Mann és munkatársai* leírták, hogy az integrin- $\alpha 1\beta 1$ nem játszik jelentős szerepet a matrilinhoz kötött sejt kapcsolatot kialakításában. A Matn2 esetében szolubilis integrin $\alpha 1\beta 1$ -gyel gyenge jelölődést tapasztaltak, míg az integrin- $\alpha 2\beta 1$ ektodomének nem mutattak semmiféle kötődést (7). Általánosságban a matrilinok és integrinek közti kölcsönhatás viszonylag gyenge, mivel a matrilinok csak gyenge sejt kapcsolatra képesek, és nem váltják ki a fokális adhéziók kialakulását. Nem tisztázott, hogy ez a gyenge integrin kapcsolat hogyan indíthatja be a jelátvitelt és miként befolyásolja a gének expresszióját (7, 8).

A matrilin-2 gén (*Matn2*) sokféle szövetben, különböző mértékben fejeződik ki (3, 5). A gén átíródik, és a fehérjét számos osteoblast, fibroblast, myoblast és epithel sejt vonal termeli. A máj oвал sejtjei, melyek nem májsejtek, Matn2 mRNS-t és fehérjét is termelnek (9). Patkány májregenerációs modell kísérletben a Matn2 a tubulusok körüli bazális membránban az oвал sejtet kirajzolva halmozódott fel, mely azt sugallja, hogy ez a fehérje fontos szerepet játszik a máj regenerációs folyamatában (9).

A *Matn2* számos daganatban is kifejeződik. A sporadikus pilocytás astrocytomát, gyermekkori agydaganatokat jellemzi a megnövekedett MATN2 mRNS és fehérjeszint (10). A közelmúltban beszámoltunk a *MATN2* megemelkedett mRNS és fehérje szintű expressziójáról humán májzsugor és májrák esetében is. Míg a normális emberi májban a Matn2 a portális erek falában lokalizálódik, addig hepatocellularis carcinómában (HCC) a jelölődés a tumoros erekben volt kimutatható (11). Ugyanakkor továbbra is kérdés maradt, miként befolyásolja a MATN2 a tumorképződés patomechanizmusát?

A matrilin gén célzott inaktiválása nem okozott fenotípusos változást transzgen egerekben (12). A *Matn2*^{-/-} egerek életképesek, szaporodóképesek voltak, és a szövettani vizsgálatok nem mutattak egyértelmű elváltozásokat a szöveti felépítésben sem az embrionális, sem a születést követő időszakban. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a Matn2 hiánya miként befolyásolja a daganatképződést egy *in vivo* kísérleti hepatocarcinogenesis modellt hoztunk létre. *Matn2*^{-/-} és vad típusú (VT) egereket kezeltünk dietil-nitrozaminnal (DEN), melyről ismert, hogy HCC-t idéz elő. Jelen munkánk

a Matn2-hiányos egerek májában megfigyelt jelentős tumorképződési hajlamot és az ebben szerepet játszó patomechanizmusokat ismerteti.

Anyag és módszer

Az állatok kezelése

A *Matn2* gén kikapcsolását embrionális őssejtekben és 129/SV egértörzsben már leírták (12). *Matn2*^{+/-} heterozigóta állatokat párosítottak, hogy *Matn2*^{+/-} (vad típusú, VT) és *Matn2*^{-/-} homozigóta egyedeket hozzanak létre a tumorigenesis vizsgálatára. Tizenöt napos, hím, VT és *Matn2*^{-/-} egereket oltottunk intraperitonealisán 15 μ g/g (testsúly) DEN-nel. Az előkísérlet során 20 egéren követtük a makroszkopikus tumorok megjelenését minden második hónapban. A kísérlet végén, 10 hónappal a DEN kezelés után az állatokat étteres érzéstelenítést követően csigolyatoréssal öltük meg. Minden csoporthoz ≥ 10 állatot használtunk, beleértve a VT, *Matn2*^{-/-} kezeletlen kontroll és DEN kezelt egereket is. Megmértük az állatok test- és májtömegét, és megszámláltuk a makroszkopikusan fellelhető tumorok számát.

Az állatkísérletek az Állategészségügyi és Ellenőrző Intézet, Csongrád megye, Magyarország, No. XVI/03047-2/2008 etikai engedélyével végeztük.

RT-PCR

Az RNS-t fagyasztott májmintákból nyertük. A folyékony nitrogénes homogenizálást követően az teljes RNS-t RNeasy Mini Kit (Qiagene, Hilden, Germany) segítségével izoláltuk a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) spektrofotométerrel mértük. A teljes RNS integritását és méret szerinti megoszlását az Experion Autimatizált Elektroforézis Állomás (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével analizáltuk.

A cDNS-t 1 μ g teljes RNS átírásával nyertük M-MLV RT Kit (Invitrogene by Life Technologies, Carlsbad, California, USA) használatával a gyártó utasításai szerint. A valós idejű PCR-t (RT-PCR) ABI Prism 7000 Szekvencia Olvasó Rendszerrel (Applied Biosystems by Life Technologies, Welterstadt, Germany) vizsgáltuk. ABI Taqman Gén Expressziós Assay-t használtunk a β -katenin (assay ID: Mm00483039_m1), p21/CIP1 (assay ID: Mm00432448_m1) esetében a gyártó utasításai szerint, és általunk tervezett Rb1 (forward: CTTGAACCTGCTTGTCCTCTC, reverse: GGCTGCTTGTGTCTCTGATT) primereket 1 μ M végkoncentrációjú Power SYBR[®] Green PCR Master Mix-szel (Applied Biosystems by Life Technologies). Belső kontrollnak egér β -aktint (assay ID: Mm00607939_s1) használtunk. Minden mintát duplikátumban, 20 μ l-es térfogatban futtatunk 50 ng cDNS-t használva rekációnként. Az expressziós értékeket a 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} módszerrel számítottuk ki.

Phospho-MAPK és Phospho-RTK antitest array-k

A foszforilációs fehérje array-khez és a western blot-hoz a fehérjét a fagyasztott májkból izoláltuk. Folyékony nitrogénes homogenizálást követően a porított májszövetet 1 ml lízispufferben (20 mM TRIS pH=7,5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 0,5% Proteáz Inhibitor Cocktail (Sigma, St. Luis, MO, USA)) oldottuk. A mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 13 000 rpm fordulatszámmal centrifu-

gáltuk 20 percig. A felülúszót tiszta csőbe mértük, a fehérje-koncentrációt Bradford-módszerrel határoztuk meg (13).

A foszfo-mitogén-aktivált protein-kináz (p-MAPK) és foszfo-receptor tirozin-kináz (p-RTK) aktivitását a reaktív foszforiláltsága alapján határoztuk meg Proteom Profiler Array (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) segítségével a gyártó utasítása szerint. A western blot során használt fehérjemintákat alkalmaztuk ennél a vizsgálatnál is. Azonos csoport-hoz tartozó három-három, homogenizált, lizispufferben (lásd korábban) oldott mintát kevertünk össze, és hígítottuk 300 µg fehérje/250 µl lizátum koncentrációban. A jeleket SuperSignal West Pico Kemiluminescens szubsztráttal mutattuk ki (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), és Kodack Image Station 4000MM digitális képalkotó rendszerrel tettük láthatóvá.

Western blot analízis

30 µg teljes fehérjét β-merkaptotetanolt tartalmazó töltő pufferben oldottuk és 95 °C-on, 5 percig forraltuk. Azonos csoportból származó három denaturált fehérjeminta keverékét 10%-os poliakrilamid gélben 30 percig 200 V-on Mini Protean vertikális elektroforézis készülékkel futtattuk (Bio-Rad Hercules, CA, USA). Ezt követően a fehérjéket PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA USA) blottoltuk egy éjszakán át 100 mA áramerősséggel. A blottolás hatékonyságát Ponceau-festéssel ellenőriztük. A membránokat 3 w/v%-os, TBS-ben oldott tejporral (Bio-Rad) blokkoltuk 1

órán keresztül, melyet az elsődleges antitesttel (p53, β-katenin, GSK-3β, p-GSK-3α/β, p-c-Myc, p44/42, p-p44/42, p21/CIP1, p-Rb, 1:500–1:1000 hígításban) való inkubálás követett 4 °C-on 16 órán át. „Loading” kontrollként β-aktint használtunk. Ezt követően a membránokat ötször TBS-0,5 V/V% Tween-20 oldattal mostuk, majd megfelelő HRP-konjugált másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk 1 órán keresztül. A jelek detektálása megegyezett a fehérje array-kenél leírtakkal. A használt ellenanyagok adatait az 1. táblázat tartalmazza.

Szöveti és immunhisztokémiai analízis

Az egérmájakat kettévágtuk, és a további vizsgálatok céljából egyik részüket lefagyasztottuk, másik részüket 10%-os formaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk a szövettani vizsgálathoz. A metszeteket a xilolos deparaffinálást követően hematoxilin-eozinnal (HE) festettük. A festett metszeteket szövettani vizsgálatnak vetettük alá.

Immunfluoreszcens jelöléshez metanol-aceton-fixált 10 µm vastag fagyasztott metszeteket használtunk. Az aspecifikus kötéseket blokkolása 10 w/v%-os szamár vagy kecske albumin/PBS oldattal 37 °C-on 1 óráig történt. A mintákat 4 °C-on egy éjszakán át elsődleges ellenanyaggal (Matn2, laminin, β-katenin, GSK-3β, p-GSK-3α/β, p-c-Myc 1:200–1:400 hígításban) inkubáltuk. A Matn2-vel és lamininnal jelölt mintákat Cy3-konjugált szamár anti-kecske-IgG és Cy2-konjugált szamár anti-nyúl-IgG antitestek (Jackson

1. táblázat

Kísérletekhez használt ellenanyagok adatai

ELSŐDLEGES ANTITESTEK	FAJ	GYÁRTÓ*	CAT. NO.	HÍGÍTÁS IHC/IF	HÍGÍTÁS WB
β-aktin	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	4967	–	1:1000
β-katenin	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	9562	1:200	1:1000
p53	Nyúl poliklonális	Abcam	ab61256	1:75	1:500
p21	Nyúl poliklonális	Abcam	ab7960	1:75	1:500
Foszfo-Rb (Ser780)	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9307	1:500	1:750
p44/42 MAP Kináz	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9102	–	1:500
Foszfo-p44/42 (Thr202/204)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	4370	1:100	1:1000
Ki-67	Nyúl monoklonális	Thermo Fischer Scientific	RM-9106	1:2	–
GSK-3β (27C10)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	9315	–	1:500
Foszfo-GSK-3α/β (Ser 21/9)	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9331	1:100	1:750
Anti-foszfo-c-Myc (Thr58)	Nyúl poliklonális	Thermo Scientific	PA1-14268	1:200	1:500
Matrilin-2	Kecske poliklonális	R&D Systems	AF3234	1:200	–
Laminin	Nyúl poliklonális	DakoCytomation	Z0009	1:400	–
MÁSODLAGOS ANTITESTEK	FAJ	GYÁRTÓ*	CAT. NO.	HÍGÍTÁS IHC	HÍGÍTÁS WB
Anti-kecske-IgG/Biotinilált	Nyúl poliklonális	DakoCytomation	E 0466	1:200	–
Anti-kecske IgG/Cy2-konjugált	Szamár poliklonális	Jackson	711-225-152	1:400	–
Anti-nyúl IgG/Cy3-konjugált	Szamár poliklonális	Jackson	705-165-147	1:400	–
Alexa Fluor® 555 anti-nyúl-IgG	Szamár poliklonális	Invitrogene	A31572	1:200	–
Anti-kecske-IgG/HRP	Nyúl poliklonális	DakoCytomation	P 0449	–	1:2000

* Cell Signaling Technology, Danvers, MA; Abcam, Cambridge, UK; Thermo Fischer Scientific Inc., Fremont, CA; Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA; R&D Systems, Minneapolis, MN; DakoCytomation, Glostrup, Denmark; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA; Invitrogene by Life Technologies, Carlsbad, California.

ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) kombinációjával inkubáltuk. A mosási lépést követően a β -katenin, GSK-3 β , p-GSK-3 α/β és p-c-Myc jelölt metszeteket Alexa Fluor 555[®] számár anti-nyúl-IgG másodlagos antitesttel (Invitrogene by Life Technologies) szobahőmérsékleten 30 percig nedves kamrában inkubáltuk. A sejtmagokat 1 μ g/ml PBS-ben oldott DAPI-val festettük 5 percig. A festett metszeteket Lucia Cytogenetics 1.5.6 programmal ellátott Nikon Eclipse E600 fluoreszcens és Bio-Rad MRC-1024 konfokális lézermikroszkóppal fotóztuk.

A paraffinba ágyazott májak esetében a deparaffinált metszetek feltárása Target Retrieval oldatban (Dako, Glostrup, Denmark), 3 percig tartó magas nyomású kuktában történt, és ezt követően 0,5 mg/ml koncentrációjú proteináz-K enzimet is alkalmaztunk 10 percig. Az endogén peroxidázok blokkolását 10% metanolban oldott H₂O₂-dal végeztük szobahőmérsékleten 30 percig. Az aspecifikus kötéseket blokkolásához normális szérumot használtunk, ezt követően a metszeteket 4 °C-on egy éjszakán át elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (p53, p-p44/42, p21/CIP1, Ki-67, p-Rb, p-p44/42, Ki-67, p-GSK3 β 1:75-1:500 hígításban). Másodlagos ellenanyagként biotinilált kecske anti-nyúl-IgG ellenanyagot használtunk, mellyel a metszeteket 30 percig, szobahőmérsékleten kezeltük. A felhasznált ellenanyagok adatait az 1. táblázat tartalmazza. A jelerősítés 1:50 koncentrációban oldott avidin-biotin komplexszel (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) történt 30 percig szobahőmérsékleten. A jeleket 3,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB) kromogén szubsztrát oldattal. A képeket az Olympus BX50 (Tokyo, Japan) mikroszkóppal készítettük el.

Statistikai analízis

A relatív génexpressziós eredmények normális eloszlását D'Agostino & Pearson omnibus normalitás teszttel végeztük a Prism 4.03 (Graphpad Software Inc.) program segítségével. A szignifikáns eltéréseket a VT kontroll vs. VT DEN, VT kontroll vs. *Matn2*^{-/-} kontroll, VT DEN vs. *Matn2*^{-/-} DEN és *Matn2*^{-/-} kontroll vs. *Matn2*^{-/-} DEN csoportok között nem-parametrikus Mann–Whitney-teszttel és Student-féle t-próbával vizsgáltuk Graphpad Prism programmal. Az egymástól független kísérlet sorozatokat a reprodukálhatóság szempontjából megvizsgáltuk. Csak a reprodukálható szignifikáns változásokat jeleztük szignifikánsként. A kapott értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

Eredmények

A *Matn2*-hiányos egerek érzékenyebbek a DEN által kiváltott carcinogenesisre

A fiatal VT kontroll egerek májában a *Matn2* fehérje a portális erek (1A ábra) és az epeutak (1C ábra) körül volt látható, részben a lamininnal (1B, 1D ábrák) azonos lokalizációban. Nem volt kimutatható reakció a *Matn2*^{-/-} egerek májában (1E ábra), mely bizonyítékul szolgál a gén hiányára.

A *Matn2* tumorigenesisben betöltött szerepének vizsgálatára HCC-modellt hoztunk létre *Matn2*^{-/-} és VT egerek egy-egy DEN kezelésével. Hat hónap után dysplastikus változások, így a kontroll egerekben tapasztaltnál magasabb frekvenciájú mitózis, a magi polimorfizmus és rendellenes kromatin-szerkezet voltak megfigyelhetők. Nyolc hónappal a DEN kezelést követően makroszkóposan észlelhető tumorok fejlőd-

tek, az átlagos tumorszám 4,25 volt a VT és 6,8 a *Matn2*^{-/-} egerekben ($n = 4, 5$).

A fenti előkísérlet alapján a második kísérlet sorozatban az állatokat már csak 10 hónappal a DEN kezelést követően vizsgáltuk (2A ábra). A belső szervek morfológiája nem változott a *Matn2* hiányában, így a máj fenotípusa sem különbözött a kontroll májakétól. A testtömegre vonatkoztatott májtömeg szignifikánsan magasabb volt *Matn2*^{-/-} egerek esetében. A VT és *Matn2*^{-/-} kezelt állatok májában makroszkopikus tumorokat nem észleltünk, azonban a *Matn2*^{-/-} kontroll májak HE metszetein tumorkezdeményeket figyelhettünk meg (lásd később). A VT DEN kezelt egerek 78%-ban, míg a *Matn2*^{-/-} DEN kezelt 100%-ban alakult ki jól látható daganat, melyek mérete is nagyobbak bizonyult (2A/1, 2A/2 ábrák). A tumorszám/egyedszám és májtömeg/ testtömeg arányok szignifikánsan magasabbak voltak a *Matn2*^{-/-} DEN kezelt állatok esetében, összehasonlítva a VT DEN kezeltékével.

A *Matn2* hiánya növeli a májsejtek proliferációs kapacitását

A *Matn2*^{-/-} egerek májában keletkező spontán tumor góccok alapján feltételezzük, hogy májsejtekben olyan elváltozások vannak, melyek hajlamossá teszik őket a rosszindulatú elváltozások kialakulására. Ezt támasztotta alá a foszfo-RTK-array, ami az EGFR fokozott foszforilációját mutatta és a foszfo-MAPK-array, ahol az ERK2, p38 δ és Akt3 aktiválódása volt látható (3A, 3B ábrák). A *Matn2*^{-/-} egermájából készült western bloton az ERK1/2 spontán foszforilációja volt megfigyelhető. Az immunhisztokémiával a daganatos fókuszok sejtjeinek magjában figyelhettünk meg foszfo-ERK1/2 pozitívítást (4A/1, 4B, 5 ábrák). Habár a foszfo-MAPK-array nem érzékelte a GSK-3 β esetében expressziójának eltéréseit a vizsgált csoportokban, a western blot a *Matn2*^{-/-} egerek májában klasszikus inaktivációt okozó foszforilációt mutatott a GSK-3 α és β esetében a Ser9 és 21 foszforilációs helyeken. Mindezek hatására a β -katenin felhalmozódott a májsejtek citoplazmájában, és csökkent a c-Myc inaktíváló Thr58 foszforilációja (3A, 4A/1, 4A/2, 4B, 5 ábrák). Ennek következtében csökkent a p21/CIP1 mRNS és fehérje mennyisége; csökkent a retinoblastoma mRNS expressziója és inaktíváló foszforilációja, mely a sejtciklus aktiválódását eredményezte (2C, 2D, 4A/1, 4A/2, 4B ábrák). Az immunhisztokémia megerősítette a western blottal kapott eredményeket (4A/1, 4A/2, 4B, 5. ábrák). A Ki-67-pozitív sejtek megnövekedett száma további bizonyítékul szolgál a *Matn2*^{-/-} májban tapasztalható megnövekedett proliferációs aktivitásra (5. ábra).

Eltérés mutatkozott a β -katenin mRNS- és fehérjeszintje között, csökkent az mRNS és nőtt a fehérje mennyisége a *Matn2*^{-/-} májban. Habár a β -katenin fehérje mennyisége nőtt, a sejtmagi lokalizációjának hiánya megkérdőjelezi a tumor-képződésben betöltött szerepét (2B, 4A/1, 4B, 5. ábrák). Míg p53 gén mRNS expressziója csökkent, a fehérjét nem tudtuk sem western blottal, sem immunhisztokémiával kimutatni (az adatok nincsenek feltüntetve).

A jelátvitel változásai a HCC indukálását követően vad típusú és *Matn2* hiányos egerekben

Hasonlóan a *Matn2*^{-/-} kontroll májakhoz, a DEN-indukált carcinoma genesiset követően is a foszfo-RTK-array-en az EGFR aktiválódott és a foszfo-MAPK-array-en az ERK2, p38 δ , Akt3, GSK-3 α/β foszforilációját figyelhettük meg (3A, 3B ábrák). Míg a VT kontroll májakban nem volt jel, addig a

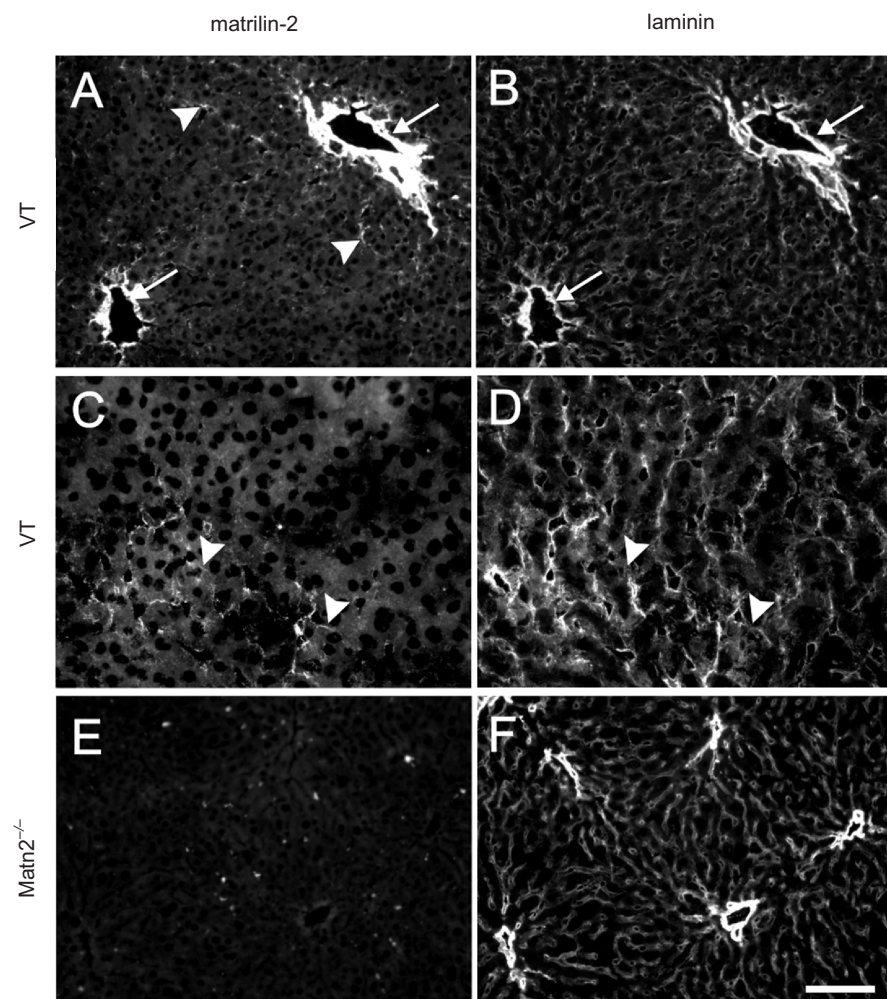
DEN kezelés hatására erős ERK1/2-aktiváció mutatkozott. Az immunhisztokémiai analízis megerősítette a western blot eredményeit, a máj praeneoplasticus gócaiban és a tumorok területén a DEN kezelt egerekben a foszforilált p44/42-t kimutató ellenanyag erős magi lokalizációjú reakciót eredményezett (4A/1, 4B, 5. ábrák).

A p21/CIP1 mRNS expressziója megemelkedett, míg a retinoblastomáé csökkent a DEN kezelés hatására (2B, 2C, 2D ábrák). Habár a mRNS-expresszió hasonló volt, a p21/CIP1 fehérje szintje különbözött a VT és *Matn2*^{-/-} DEN kezelt állatokban. A fehérje koncentrációja VT-kontrollhoz képest a VT DEN kezelt májokban megnőtt. Csak csekély emelkedést tudunk mérni a DEN kezelt *Matn2*^{-/-} májak esetében a *Matn2*^{-/-} kontrollmintákhoz képest, azonban a p21 szintje mindkettőben alacsonyabb volt a VT kontrollmájak értékeinél (4A/1, 4A/2, 4B ábrák). Ezzel összhangban az immunhisztokémiai analízis a VT DEN kezelt májokban a p21/CIP1 fehérje mennyiségének növekedését és sejtmagi reakcióját, míg a *Matn2*^{-/-} DEN kezelt májokban a fehérje csökkenését mutatta (5. ábra). A β -katenin fehérje expressziója megnőtt a DEN kezelt májokban, a legintenzívebb festődés a *Matn2*^{-/-} DEN kezelt mintákban látható. A DEN kezelt májak alacsony β -katenin mRNS egyensúlyi állapota arra utal, hogy a megnövekedett fehérjemennyiség a β -katenin csökkent inaktivációjának eredménye.

VT kontrollmájak membrán reakciójával szemben a *Matn2*^{-/-} és DEN kezelt májokban a β -katenin a citoplazmában felhalmozódott fel, emellett egyik esetben sem találtunk jelet a magban (5. ábra).

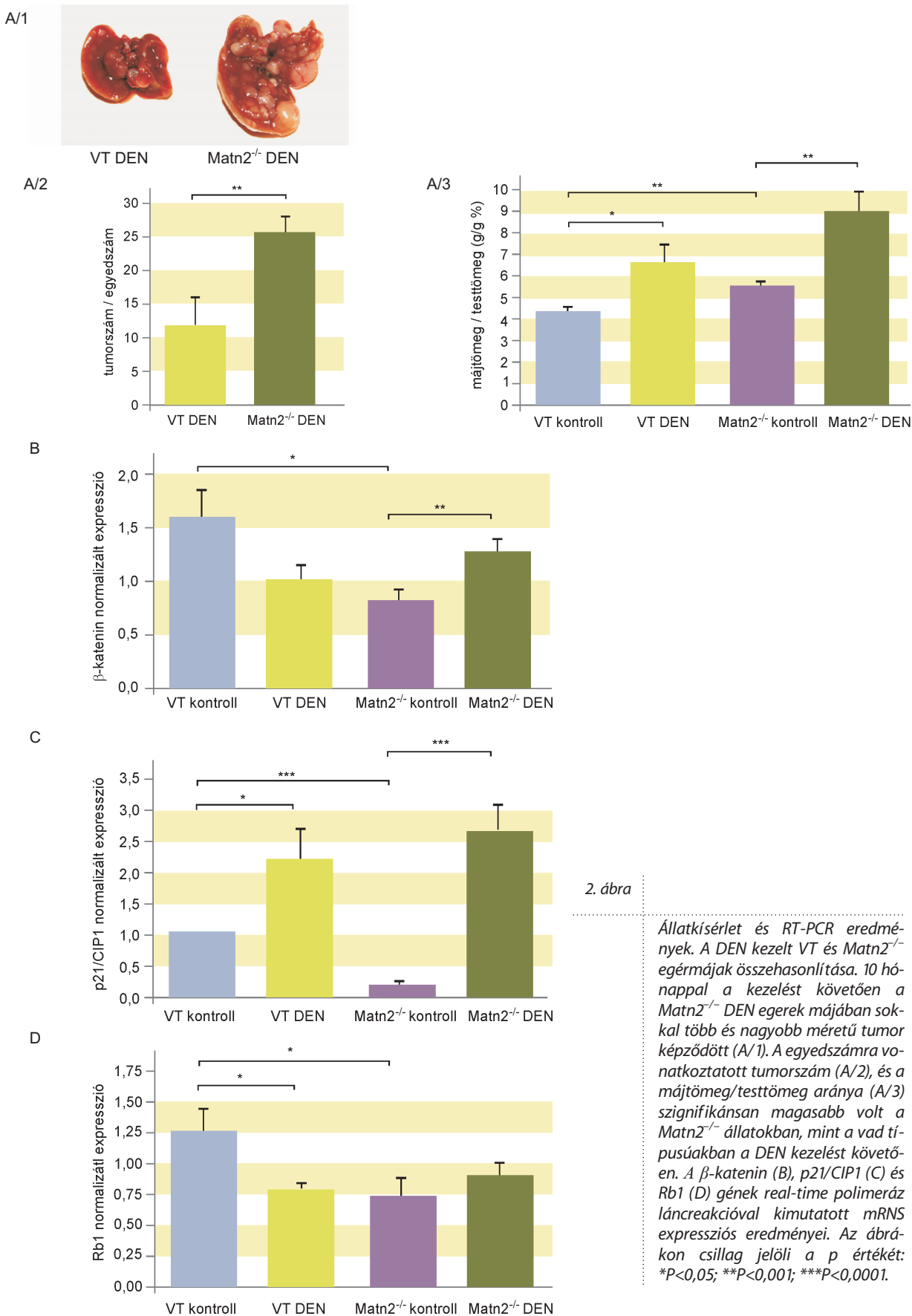
Diszkusszió

Annak ellenére, hogy viszonylag sokat tudunk a *Matn2* szerkezetéről és szöveti elhelyezkedéséről, szerepe máig tisztázatlan (3, 5, 14, 15). A *Matn2* egy ECM fehérje, amelyről megállapították, hogy a máj progenitor oval sejtjei is termelik (9). Mindössze egy közlemény foglalkozik azzal, hogyan változik a *Matn2* a HCC-ben, de ez a vizsgálat nem érinti a jelátvitel változásait (11). Mivel károsítás nélkül a *Matn2*^{-/-} állatok máján nem látszódtott fenotípusos eltérés, jelen tanulmányban funkcionális vizsgálat céljából egy már bevált DEN indukálta HCC-modellt alkalmaztunk (12). A makroszkópos tumorgócok kialakulásához 10 hónapra volt szükség a VT és *Matn2*^{-/-} egerekben, azonban az utóbbiak májában szignifikánsan több daganat képződött. Feltűnő különbség volt, hogy a *Matn2*^{-/-} egerekben a sporadikus mikroszkopikus tumor kezdemények alakultak ki a DEN kezelés nélkül is. Ez arra utal, hogy a *Matn2* hiánya fokozza a májsejtek proliferációs aktivitását és elősegíti a daganatképződést. Ezek a megfigyelések a *Matn2* máj carcinogenesisrel szembeni védő szerepé-



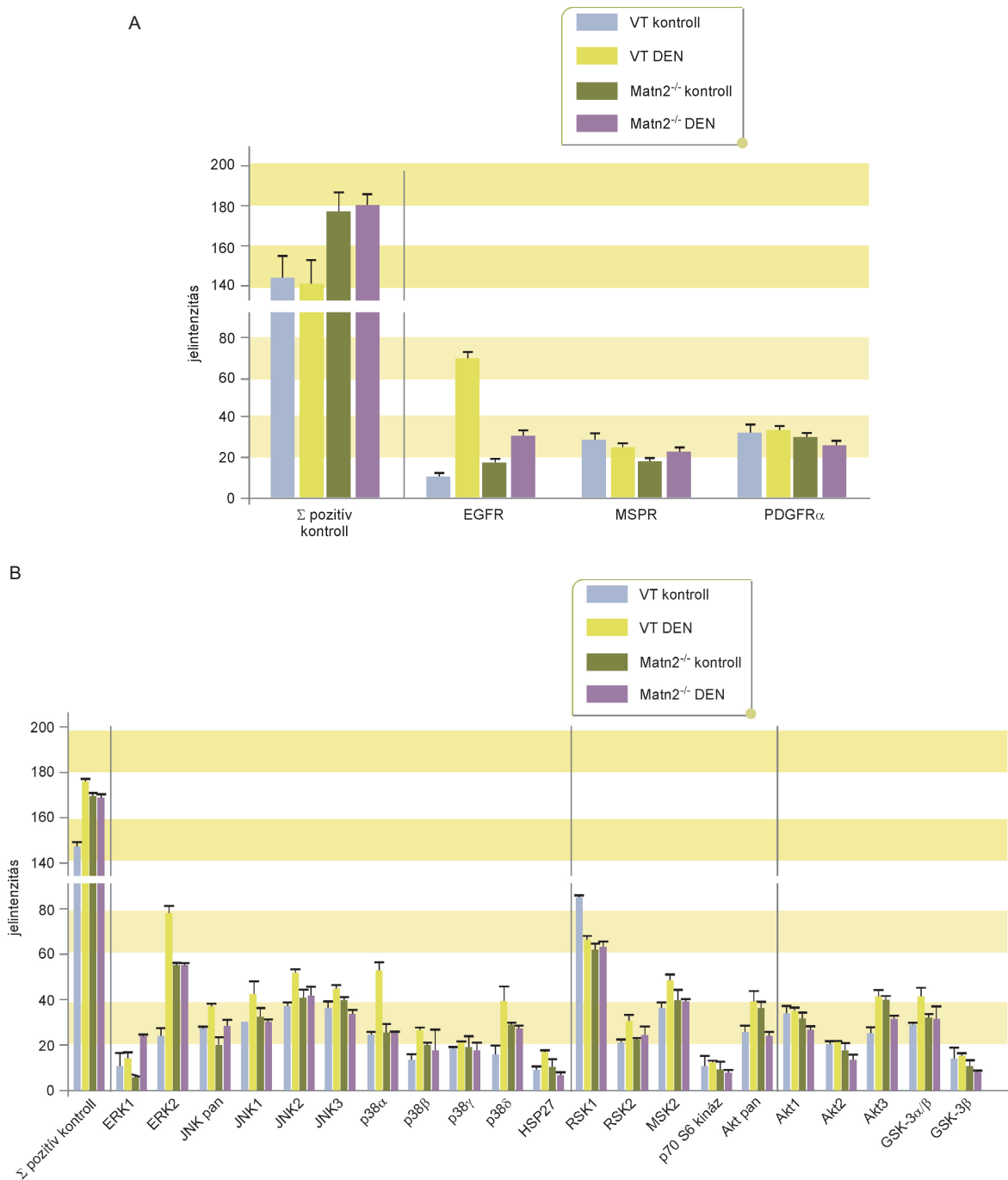
1. ábra

A *Matn2* immunreakció fiatal egerek májában (A, B). A *Matn2* immunfestődés a portális erek körül a legintenzívebb (nyíl), de az epeutak körül (nyilak) is megtalálható a 40 napos VT egerek fagyaszott májmetszetein (C, D). A *Matn2* parciálisan kolokalizál a lamininnal, azonban vannak olyan struktúrák, ahol a *Matn2* jel sokkal intenzívebb (nyilak) (E, F). A *Matn2*^{-/-} egerek májában nincs jel. Az A, B, E, F ábrákon feltüntetett lépték hossza 0,1 mm, a C és D ábrák esetében 0,05 mm.



2. ábra

Állatkísérelt és RT-PCR eredmények. A DEN kezelt VT és Matn2^{-/-} egérmájak összehasonlítása. 10 hónappal a kezelést követően a Matn2^{-/-} DEN egerek májában sokkal több és nagyobb méretű tumor képződött (A/1). A egység számra vonatkoztatott tumorszám (A/2), és a májtömeg/testtömeg aránya (A/3) szignifikánsan magasabb volt a Matn2^{-/-} állatokban, mint a vad típusúakban a DEN kezelést követően. A β-katenin (B), p21/CIP1 (C) és Rb1 (D) gének real-time polimeráz láncreakcióval kimutatott mRNS expressziós eredményei. Az ábrákon csillag jelöli a p értéket: *P<0,05; **P<0,001; ***P<0,0001.



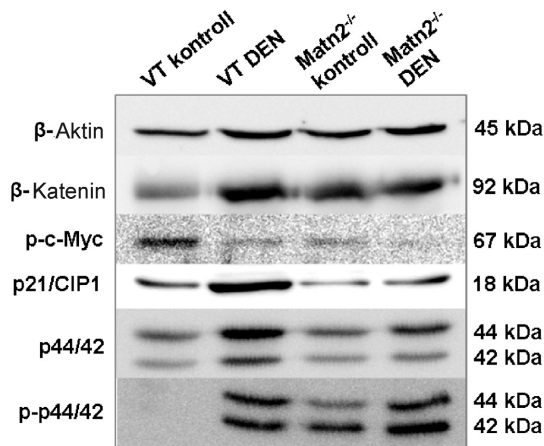
3. ábra

Jelátviteli utak vizsgálata foszfo-RTK antitest array (A) és foszfo-MAPK antitest array (B) segítségével. Az RTK-receptorok közül, csak az EGFR aktivációja mutatott eltérést a csoportok között.

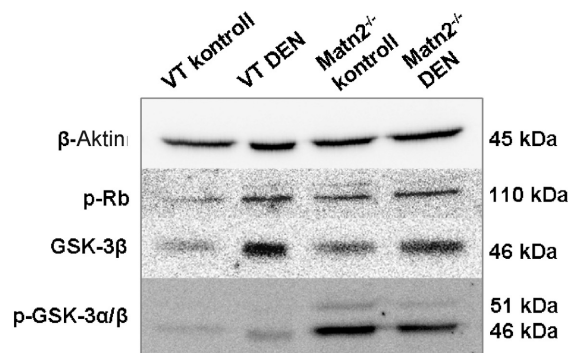
re hívják fel a figyelmet. A háttérben zajló mechanizmusok felderítéséhez kulcsfontosságú volt a jelátviteli fehérjék változásainak vizsgálata.

Ahhoz, hogy a jelátvitel kiindulópontjára rátaláljunk, tirozin-kináz-receptorokat vizsgáltunk foszfo-RTK-array segítségével, mely csak az EGFR foszforilációját mutatta ki.

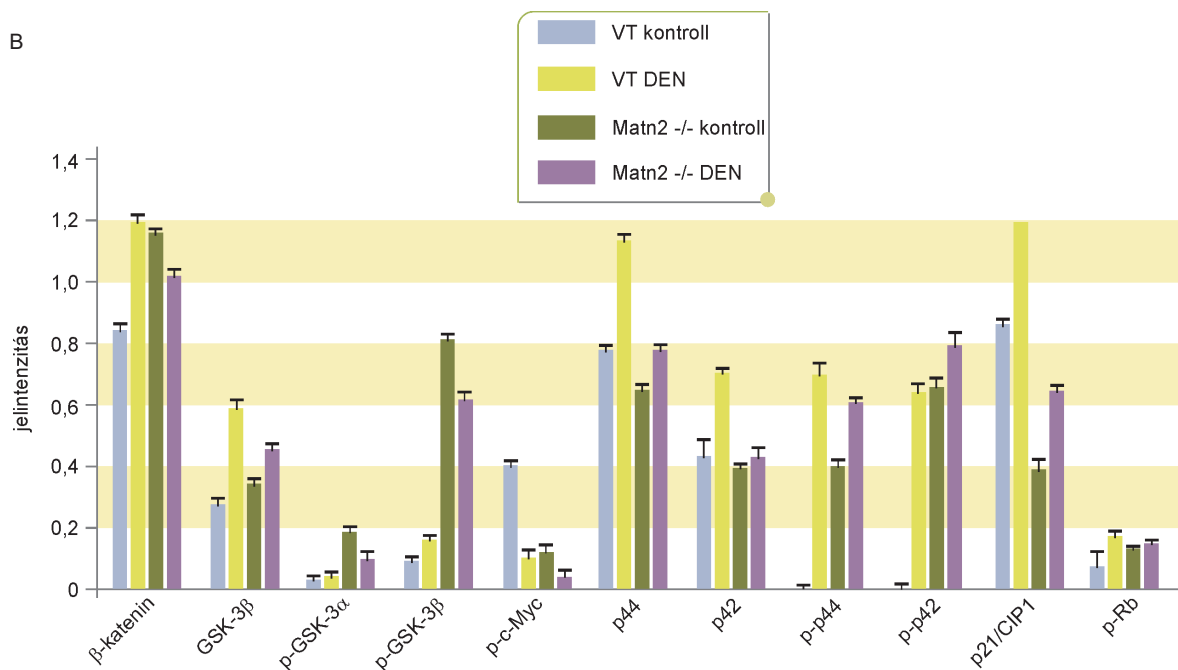
A/1



A/2



B



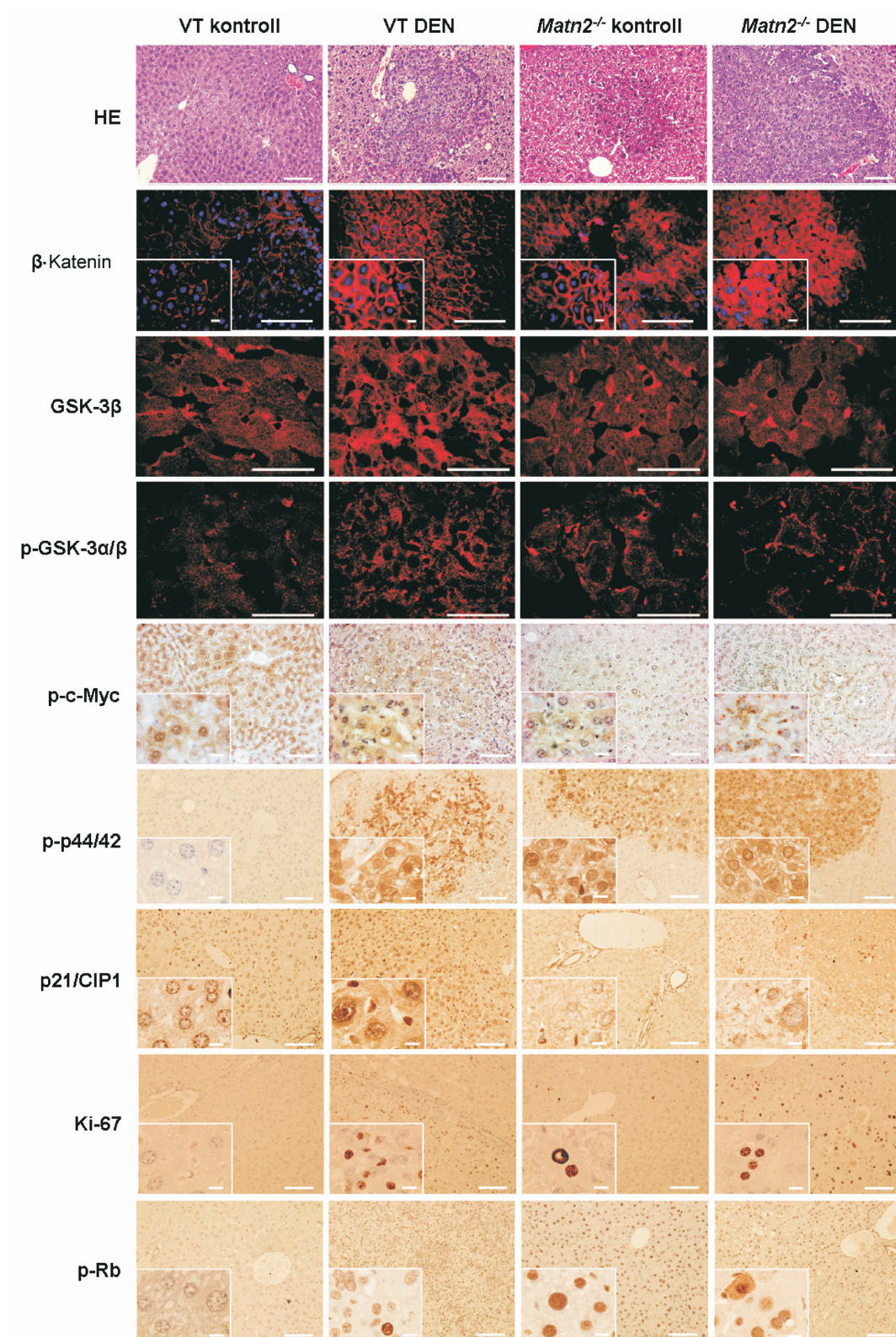
4. ábra

A szabályozó fehérjék western blot adatai VT kontroll, VT DEN, Matn2^{-/-} kontroll és Matn2^{-/-} DEN kezelt egércsoportokban (A). A csíkok β-aktinra normalizált intenzitás értékei láthatók a grafikonon (B).

Mivel a Matn2 számos EGF-szerű domént tartalmaz, azt feltételezzük, hogy a Matn2 vetelkedni képes az EGF-liganddal a receptorhoz kötődésért. Ez azt jelenti, hogy a Matn2 hiánya növeli az EGFR ligandkötő képességét, ami az aktiválódását eredményezi. Azonban feltételezésünk bizonyításához további vizsgálatok szükségesek. Emellett próbáltuk, eddig sikertelenül azokat az integrinreceptorokat is feltérképezni, melyek befolyásolhatják az aktivációt. Korábbi adatok azonban kétségbe vonják a Matn2-integrin kapcsolat jelentőségét (7).

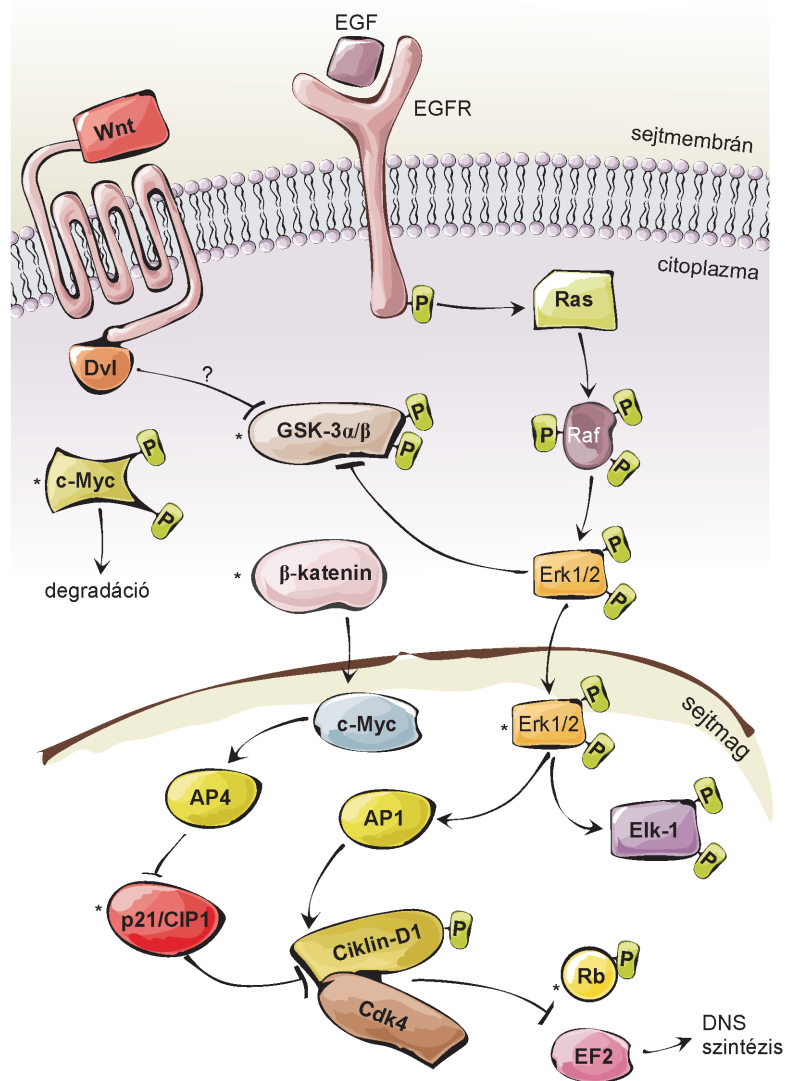
Továbbiakban alkalmazott foszfo-MAPK-array rávilágított az aktiválódott ERK2 kiemelkedő szerepére, de a p38δ, pan Akt és Akt3 foszforilációja is megnőtt. Az eredmények bizonyítására készített western blotok ismét a p44/42 (ERK1/2) foszforilációját erősítették meg a Matn2^{-/-} májak

esetében. Úgy tűnik tehát, hogy a Matn2 hiányában aktiválódó kóros folyamatok egyik kritikus pontja a MAPK útvonal aktiválódása, mely vezethet a májsejtek daganatos irányú átalakulásához. Jóllehet a foszfo-MAPK array-vel ezt kevésbé tudtuk bizonyítani, a GSK-3α/β foszforilációja, melyet a western blot igazolt tekinthető az aktiválódás másik kritikus elemének. A GSK-3α/β fehérjéket a Ser9 és Ser21 helyen történő foszforilációval inaktíválnak, melyek ezzel működési pozícióba juttatják a c-Myc és β-katenin fehérjéket. Ez azt jelenti, hogy az ERK1/2 út mellett a Wnt útvonal is szerepet kap az eseményekben. Habár irodalmi adatok szerint többnyire az Akt fehérje az, ami kikapcsolja a GSK-3β-t (16) és a foszfo-MAPK-array enyhe pan Akt foszforilációt jelzett, a western blot eredmények eddig nem tudták megerősíteni az Akt szere-



5. ábra

Az általunk vizsgált fehérjék immunhisztokémiai analízise VT kontroll, VT DEN, *Matn2*^{-/-} kontroll és *Matn2*^{-/-} DEN kezelt egércsoportokban. Az ábrákon feltüntetett lépték hossza a paraffinos metszetek esetében 0,1 mm és 0,001 mm és 0,05 mm a fagyasztott metszeteknél. A GSK festéseket MRC-1024 konfokális lézer scanning mikroszkóppal, a β -katenin immunhisztokémiákat Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal, a többi festődést Olympus BX50 fénymikroszkóppal vizsgáltuk.



6. ábra

Feltételezett jelátviteli mechanizmus sematikus ábrázolása *Matn2^{-/-}* egerekben. Az általunk vizsgált molekulákat csillaggal jelöltük. A megnövekedett expressziójú és/vagy aktiválódott fehérjéket fehér háttér, a lecsökkent és/vagy inaktíválódott fehérjéket szürke háttér jelzi.

pét. *Ding és munkatársai* leírták, hogy az ERK1/2 is képes a GSK-3β inaktíválására a Thr43 foszforilációjával (17), továbbá a GSK-3β gátlása előidézhető az ERK1/2 foszforilációján keresztül a PKCδ aktivációjával is (18).

A GSK-3β inaktívációjával összhangban annak lehettünk tanúi, hogy a β-katenin fehérje mennyisége megnőtt és a c-Myc inaktívációját okozó Thr58 foszforiláció csökkent. A GSK-3β által közvetített gátló hatás kiesése tehát a májsejtek proliferatív állapotba kényszeríti (19). Ezt erősítette meg a Ki-67 immunreakció is, ami a kezeletlen *Matn2^{-/-}* egerek aktivált májsejtjeiben jelentkezett.

Eddig nem találtunk magyarázatot a β-katenin sejtmagi lokalizációjának hiányára. A β-katenin működését szabályozó hatásán túl *Jin és munkatársai* arról számolt be, hogy a GSK-3β-nak fontos szerepe van a Cdk4/ciklin-D3 komplex

foszforiláció útján történő inaktíválásában. Ez egy alternatív magyarázat lehet arra, hogy a GSK-3β inaktívációja miként serkenti a proliferációt (20).

Az eddig vázolt tényekhez jól illeszkednek a p21/CIP1 eredmények. A p21/CIP1 szintje megnőtt a DEN kezelés hatására a VT állatok májában, ami összhangban van az irodalmi adatokkal (21). Ezzel szemben a *Matn2* hiányában a p21/CIP1 fehérje koncentrációja csökkent, és ez a DEN kezelés hatására sem változott meg. Ez azt jelenti, hogy a *Matn2* által befolyásolt jelátvitel elengedhetetlen a p21/CIP1 szint növekedéséhez a DEN által kiváltott májcarcinogenesisben. A p21/CIP1 mennyiségének csökkenése jól magyarázható a GSK-3β inaktíválódásával, melynek hatására a c-Myc aktiválódik. A továbbiakban a c-Myc indukálja az AP4-et, ami a p21/CIP1 gátló transzkripciós faktora (22).

Az irodalom már beszámolt a DEN kezelés ERK1/2 aktíváló, p21/CIP1 növelő és stabilizáló hatásáról (23). Ez a p21/CIP1 lehet részben funkcionálisan aktív, ami kevesebb tumorgócot eredményezett a VT DEN kezelt egérmájokban. Valóban tanúi lehettünk a p21/CIP1 mRNS- és fehérjeszintű fokozódásának a VT DEN kezelt állatok esetében. Úgy tűnik azonban, hogy ez a mechanizmus nem működik a *Matn2*^{-/-} egerekben, ahol a p21/CIP1 mRNS és fehérje mennyisége csökkent, jelezve a GSK-3β-c-Myc-p21/CIP1 tengely aktiválódását. Ez a p21/CIP1 szintézis transzkripció szintű gátlását eredményezte. A fentiek mellett az az adat, hogy a *Matn2*^{-/-} DEN egerekben a p21/CIP1 megemelkedett mRNS szintjével szemben a fehérje mennyisége csökkent, felveti a szintézis gátlás vagy fokozott lebontás lehetőségét. Ennek alapján a *Matn2* p21/CIP1 proteolízis gátló hatása is felvethető. Ez azt jelenti, hogy a már említett p21/CIP1 stabilizáció valószínűleg *Matn2*-függő (23).

A p21/CIP1 fehérje inaktivációjában egyéb mechanizmusok is közrejátszhatnak. Leírták, hogy a kalretikulín gátolja a molekula transzlációját (24), a mir106 pedig a fehérjét lebontó proteozóma-rendszert aktiválja (25).

Az Rb fehérje fokozott Ser780 foszforilációja arra utal, hogy a p21/CIP1 gátlása miatt a Rb-t egy Cdk4/CyclinD3 komplex foszforilálja és gátolja (20). Az is ismert, hogy az ERK1/2 összekapcsolódhat a Cdk4/ciklin-D1 komplexszel, elősegítve annak működését (26). Ez a mechanizmus szintén szerepet játszhat a *Matn2*^{-/-} egerek májában megnövekedett Rb foszforilációban.

A változások együttesen fogékonyá teszik a kezeletlen *Matn2*^{-/-} állatokat a májrák kialakulása iránt (6 ábra). Munkánk a *Matn2* hiánya miatt kialakult hepatocarcinogenesis 3 fontos tényezőjére világít rá:

- ▶ MAPK útvonal aktivációja,

- ▶ a GSK-3β inaktivációja, ami a β-katenin mennyiségét fokozza és a c-Myc protoonkogén aktiválódását idézi elő,
- ▶ a p21/CIP1 inaktivációja az Rb fehérje következményes foszforilációjával, melyet a Cdk4/ciklin-D3 vagy a Cdk4/ciklin-D1 idéz elő.

A VT kontrollmájak kivételével, ahol a β-katenin reakció a membránban látható, a fehérje a citoplazmában halmozódott fel sejtmagi lokalizáció nélkül. Jelenleg nincs elképzelésünk arra, hogy a β-katenin mért nem transzlokálódik a magba. Az irodalom szerint lokalizációját a kötődő fehérjék hozzáférhetősége és foszforilációja határozza meg. E feltevés tisztázása a jövő feladata (27).

A p53 gén mutációja gyakori a különböző típusú humán rákokban és gyakran pontmutációval jár (28). A *Matn2*^{-/-} egerek májában a p53 mRNS expressziója alacsonyabb volt, mint a VT májban (az adatokat nem mutatjuk). A p53 fehérje egyik általunk vizsgált májmintában sem volt kimutatható. Ebből arra következtethetünk, hogy valószínűleg rövid felezési idejű vad típusú p53 van jelen VT és *Matn2*^{-/-} egerek májában.

Összefoglalva, adataink egyértelműen jelzik, hogy az itt leírt DEN kezelt „knock out” állatmodell teljes mértékben alkalmas a hepatocarcinogenesis vizsgálatára, a korábbi közleményekben foglaltakat megerősíti és fontos új eredményekkel egészíti ki. A *Matn2* hiánya sokkal érzékenyebb teszi a májat a hepatocarcinogenesis folyamatával szemben. Jóllehet a *Matn2*^{-/-} egerek májában szabad szemmel nem találtunk tumorokat, a tumorképződésre való fogékonyág egyértelműen bizonyítható volt a szövettani vizsgálattal. A DEN kezelt állatokon végzett májrák indukció során a különbség szabad szemmel is egyértelművé vált.

Ez a tanulmány bizonyítja, hogy a *Matn2* tumorszuppresszor szereppel bír a hepatocarcinogenesis során. Munkánkkal három lehetséges forráspontot sikerült felderítenünk, ahol a molekula beavatkozhat a daganatképződés folyamatába.

Irodalom

1. Deak F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1999; 18:55-64.
2. Wagener R, Ehlen HW, Ko YP, Kobbe B, Mann HH, Sengle G, et al. The matrilins—adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett.* 2005; 579:3323-9.
3. Deak F, Piecha D, Bachrati C, Paulsson M, Kiss I. Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J Biol Chem.* 1997; 272:9268-74.
4. Mates L, Korpos E, Deak F, Liu Z, Beier DR, Aszodi A, et al. Comparative analysis of the mouse and human genes (*Matn2* and *MATN2*) for matrilin-2, a filament-forming protein widely distributed in extracellular matrices. *Matrix Biol.* 2002; 21:163-74.
5. Piecha D, Muratoglu S, Morgelin M, Hauser N, Studer D, Kiss I, et al. Matrilin-2, a large, oligomeric matrix protein, is expressed by a great variety of cells and forms fibrillar networks. *J Biol Chem.* 1999; 274:13353-61.
6. Piecha D, Wiberg C, Morgelin M, Reinhardt DP, Deak F, Maurer P, et al. Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins. *Biochem J.* 2002; 367:715-21.
7. Mann HH, Sengle G, Gebauer JM, Eble JA, Paulsson M, Wagener R. Matrilins mediate weak cell attachment without promoting focal adhesion formation. *Matrix Biol.* 2007; 26:167-74.
8. Klatt AR, Becker AK, Neacsu CD, Paulsson M, Wagener R. The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43:320-30.
9. Szabo E, Lodi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deak F, et al. Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol.* 2007; 26:554-60.
10. Sharma MK, Watson MA, Lyman M, Perry A, Aldape KD, Deak F, et al. Matrilin-2 expression distinguishes clinically relevant subsets of pilocytic astrocytoma. *Neurology.* 2006; 66:127-30.
11. Szabo E, Korpos E, Batmunkh E, Lotz G, Holczbauer A, Kovalszky I, et al. Expression of matrilin-2 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14:15-22.
12. Mates L, Nicolae C, Morgelin M, Deak F, Kiss I, Aszodi A. Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol.* 2004; 23:195-204.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
14. Pan OH, Beck K. The C-terminal domain of matrilin-2 assembles into a three-stranded alpha-helical coiled coil. *J Biol Chem.* 1998; 273:14205-9.

15. Muratoglu S, Krysan K, Balazs M, Sheng H, Zakany R, Modis L, et al. Primary structure of human matrilin-2, chromosome location of the MATN2 gene and conservation of an AT-AC intron in matrilin genes. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 90:323-7.
16. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995; 378:785-9.
17. Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, et al. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell.* 2005; 19:159-70.
18. Wang Q, Zhou Y, Wang X, Evers BM. Glycogen synthase kinase-3 is a negative regulator of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene.* 2006; 25:43-50.
19. Gregory MA, Qi Y, Hann SR. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem.* 2003; 278:51606-12.
20. Jin J, Wang GL, Shi X, Darlington GJ, Timchenko NA. The age-associated decline of glycogen synthase kinase 3beta plays a critical role in the inhibition of liver regeneration. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:3867-80.
21. Park DH, Shin JW, Park SK, Seo JN, Li L, Jang JJ, et al. Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat. *Toxicol Lett.* 2009; 191:321-6.
22. Jung P, Hermeking H. The c-MYC-AP4-p21 cascade. *Cell Cycle.* 2009; 8:982-9.
23. Arakawa T, Hayashi H, Itoh S, Takii T, Onozaki K. IL-1-induced ERK1/2 activation up-regulates p21(Waf1/Cip1) protein by inhibition of degradation via ubiquitin-independent pathway in human melanoma cells A375. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 392:369-72.
24. Iakova P, Wang GL, Timchenko L, Michalak M, Pereira-Smith OM, Smith JR, et al. Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J.* 2004; 23:406-17.
25. Borgdorff V, Lleonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, et al. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene.* 2010; 29:2262-71.
26. Densham RM, Todd DE, Balmanno K, Cook SJ. ERK1/2 and p38 cooperate to delay progression through G1 by promoting cyclin D1 protein turnover. *Cell Signal.* 2008; 20:1986-94.
27. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda).* 2007; 22:303-9.
28. Edamoto Y, Hara A, Biernat W, Terracciano L, Cathomas G, Riehle HM, et al. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer.* 2003; 106:334-41.

A komplementparaméterek előre jelzik a C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditaer angiooedema súlyosságát

Complement pathway parameters predict disease severity in hereditary angioedema

Csuka Dorottya
Varga Lilian
Füst György
Prohászka Zoltán
Farkas Henriette

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés.* A funkcióképes C1-inhibitor (C1-INH) hiányában kialakuló hereditaer angiooedema (HANO-C1-INH) autoszomális domináns módon öröklődő betegség, amelynek etiológiájában a C1-INH génjében bekövetkező mutáció játszik szerepet. A kórképre jellemző angiooedemas epizódok súlyossága és gyakorisága előre nem jósolható meg a rendelkezésünkre álló módszerekkel.

Célkitűzés. Célünk volt, hogy megvizsgáljuk, van-e összefüggés a HANO-C1-INH súlyossága és a komplementaktivációs termékek szintje között, mutat-e összefüggést a kezeléssel, valamint előre jelezhető-e ezen paraméterek alapján a HANO-C1-INH súlyossága.

Módszer. A komplementaktivációs termékek (C1rC1sC1-INH, C3bBbP, SC5b-9), valamint a funkcionális C1-INH szint és a HANO-C1-INH súlyossága (éves rohamszám, illetve a súlyos rohamok kezelésére alkalmazott C1-INH koncentrátum (C1-INHcc) mennyisége) közötti összefüggéseket 105 beteg bevonásával vizsgáltuk.

Eredmények. HANO betegekben a medián C1rC1sC1-INH-szint emelkedett volt az egészséges egyénekhez képest (32,8 U/ml vs. 3,4 U/ml; $p < 0,0001$). Mind a teljes beteg populációban, mind a danazzal kezelt csoportban szignifikáns korrelációt találtunk a C1rC1sC1-INH, illetve funkcionális C1-INH-szintek, valamint a súlyossági markerek (éves rohamszám, illetve elfogyasztott C1-INHcc száma) között. Eredményeink alapján mind a C1rC1sC1-INH-, mind a funkcionális C1-INH-szint prediktív értékű a betegség súlyosságát illetően, akár az éves rohamszámot (OR=4,38 [1,43-13,43], $p=0,010$), akár az elfogyasztott C1-INHcc számát (OR=11,78 [2,54-54,67], $p=0,002$) vesszük figyelembe.

Következtetések: Az általunk leírt prediktív paraméterek segítséget nyújthatnak a HANO-C1-INH betegek komplex ellátásában és az egyéni kezelési stratégia kialakításában.

KULCSSZAVAK hereditaer angiooedema, C1-inhibitor, komplementaktiválás, C1rC1sC1-INH, C3bBbP, SC5b-9

SUMMARY *Introduction:* Hereditary angioedema (HAE-C1-INH), caused by deficiency of functional C1-inhibitor (C1-INH), is a rare autosomal dominant disorder. However, the frequency and severity of the angioedema episodes cannot be predicted by the recently used methods.

Aim: Our aim was to analyze the relationship between the severity of HAE-C1-INH and the generated complement activation products, as well as to assess the predictive value of these parameters on disease severity.

Methods: We studied the association between disease severity and complement activation products in 105 HAE-C1-INH patients. Disease severity was characterized by the frequency of angioedema attacks or alternatively, by the number of C1-INH concentrate ampoules (C1-INHcc) used for the treatment of attacks.

Results: Median C1rC1sC1-INH level was higher (32,8 U/ml vs. 3,4 U/ml; $p < 0,0001$) in patients, compared to controls. C1rC1sC1-INH and functional C1-INH concentrations strongly correlated with attack number and amount of C1-INHcc, both in the whole patient population and in the subgroup of patients on danazol prophylaxis. Both C1rC1sC1-INH and C1-INH are suitable for predicting disease severity based on attack frequency and number of C1-INHcc (OR=4,38 [1,43-13,43], $p=0,010$ and 11,78 [2,54-54,67], $p=0,002$, respectively).

Conclusions: We presume that both C1rC1sC1-INH and C1-INH might prove sensitive predictors of the severity of HAE-C1-INH, a disease characterized by unpredictable edematous attacks.

KEY WORDS hereditary angioedema, C1-inhibitor, complement activation, C1rC1sC1-INH, C3bBbP, SC5b-9

Semmelweis Egyetem,
III. Sz. Belgyógyászati Klinika

LEVELEZÉSI CÍM:

Csuka Dorottya
Semmelweis Egyetem,
III. Sz. Belgyógyászati Klinika
1125 Budapest, Kútvolgyi út 4.

E-mail:

csukadorka@gmail.com

Rövidítések

C1-INH	C1-inhibitor
C1-INHcc	C1-inhibitor koncentrátum
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HAE-C1-INH	hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency
HANO-C1-INH	C1-inhibitor-hiány következtében kialakuló hereditaer angiooedema

Bevezetés

A funkcionális C1-inhibitor (C1-INH) hiányában kialakuló hereditaer angiooedema (HANO-C1-INH) autoszomális domináns módon öröklődő betegség, amelynek etiológiájában a C1-INH génjében bekövetkező mutáció játszik szerepet (1). Az I-es típusú HANO-ban (a betegek 85%-a) a C1-INH fehérje szintje csökkent, míg a II-es típusú HANO-ban (a betegek 15%-a) funkcióképtelen fehérje termelődik a mutáns génről, ezért a C1-INH szérum koncentrációja normális, vagy kórosan magasnak mutatkozik az albuminhoz való kötődése miatt. Mindkét típusban a C1-INH aktivitás 5–30% körüli, alatta marad a várható 50%-nak, aminek egyetlen teljesen expresszálandó allél esetében kellene lennie. Becslések szerint a ritka kórképek közé tartozó HANO-C1-INH világszerte 1:10 000–50 000 embert érint (1). A betegség jellegzetes tünetei a subcutan lokalizációjú és/vagy a felső légutak valamint a gastrointestinalis traktus nyálkahártyáján jelentkező oedemák, melyek kialakulásában a bradikinin játszik elsődleges szerepet (2). A felső légutak nyálkahártyáján kialakuló roham néhány órán belül fulladáshoz vezethet (3). A gyomor-béltraktus falán jelentkező submucosus oedema során pregnantás tünet a hányinger, hányás, görcsös hasi fájdalom és a rohamokat követő vizes hasmenés. Mivel a HANO-C1-INH abdominalis rohamai akut has klinikai képét utánozhatják, a betegek gyakran esnek át fölösleges sebészi beavatkozásokon (laparotomia, laparoscopia) a tünetek kapcsán, ám a műtétek során oedemás bél falon kívül egyéb kóros eltérést nem találtak a hasban. A differenciáldiagnosztikában elsődleges szerepe van a hasi ultrahangvizsgálatnak. Subcutan roham leggyakrabban végtagokon, arcon, szemhéjakon, nyakon, törzsen, glutealis tájon, nemi szerveken jelentkezik. Az oedemás léziók többnyire nem fájdalmasak, bőrpírral nem járnak, és nem viszketnek, mivel az oedema a bőr mélyebb rétegeiben helyezkedik el, ahol kevesebb a hízósejt és a szenzoros idegvégződés. A bőrön megjelenő angiooedema akadályozhatja a beteget napi tevékenységében, de ritkán okoz lokális vagy szisztémás károsodást. A rohamok megjelenési gyakorisága és súlyossága nemcsak egy egyénen belül, hanem egy család érintett tagjait tekintve is kiszámíthatatlan, nagy variabilitást mutat (4, 5). Az oedemás epizódok nagyfokú változékonysága genetikai (6-10) és környezeti tényezőkkel (11, 12) magyarázható.

HANO-C1-INH-ban a funkcióképes C1-INH hiánya a plazma-enzimrendszerek kontrollálatlan aktiválódását okozza, így bradikinin képződik, amely növeli a kapillárisok falának átteresztőképességét. Ennek következtében az érpályából a plazma a szövetek közötti térbe áramlik, angiooedema kialakulásához vezetve (1). A tünetek legtöbbször már gyermekkorban jelentkeznek (populáció 50%-a); a korai diagnózis és a kezelés bevezetése alapvető fontosságú a beteg életminősége szempontjából.

A HANO-C1-INH terápiája az ismert rohamot provokáló tényezők elkerülését, a kialakult angiooedema kezelését, illetve a tünetek megelőzésére alkalmazott terápiát foglalja ma-

gába. Jelenleg a rohamok akut kezelése a hiányzó fehérje pótlásával, tisztított C1-inhibitor koncentrátum (C1-INHcc) adásával történik hazánkban. Megelőző kezelésre attenuált androgént (danazol), tranexámsavat, illetve speciális esetekben C1-INHcc-t alkalmazunk, a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően (13).

A terápia bevezetése előtt, illetve hatékonyságának monitorozása során a kezelő orvos csupán retrospektív módon, a beteg beszámolóira (évenként átélt rohamok száma, súlyossága) hagyatkozhat a betegség súlyosságának megítélésében (14, 15). Fontosnak tartottuk, hogy találjunk egy olyan objektív laboratóriumi markert, amely a betegek beszámolóit kiegészítve, ettől független képet ad a HANO-C1-INH súlyosságáról. Korábban leírtuk, hogy a kezelésben még nem részesült betegek diagnóziskor mért funkcionális C1-INH szintje összefüggést mutat a betegség súlyosságával (16). Feltételeztük, hogy a C1-INH mellett a C1-INH által szabályozott aktivációs termékek is további kiegészítő markerek lehetnek (17). C1-INH hiányában, az oedemás roham során a komplement, kinin, koagulációs és fibrinolitikus rendszerek kontrollálatlanul aktiválódnak (18). A C1-INH és az általa szabályozott aktív enzimek komplexet képeznek. Az is ismert, hogy a komplementrendszer aktiválódása során fokozott mértékben képződik a C1-INH és a C1 fehérje által alkotott komplex (C1rC1sC1-INH), és tartósan magas szintet mutat HANO-C1-INH betegekben, tünetmentes időszakban is (19-21). A koagulációs kaszkád folyamatos aktiválódása következtében a protrombin fragmens 1+2 szint és a fibrinolitikus rendszer aktiválódására utaló D-dimer-szint is némileg magasabb HANO-C1-INH betegekben, még remisszióban is (22, 23). Ugyanakkor a C1-INH és kallikrein, illetve XII-es faktor által alkotott komplexek szintje nem különbözött rohammentes időszakban a kontrolloktól (16, 21, 24). Mínt hogy a C1-INH egyedüli regulátora a C1 komplement fehérjének, ezért várakozásunk szerint ígéretes marker lehet a komplementrendszer aktiválódása során fokozott mértékben képződő, a C1-INH és a C1 fehérje által alkotott komplex (C1rC1sC1-INH), amely előzetes vizsgálataink alapján jelentős individuális különbséget mutat HANO-C1-INH betegekben, tünetmentes időszakban is, de felvetődött a komplementrendszer további (alternatív és terminális) szakaszán keletkező aktivációs markerek lehetséges szerepe is.

Célkitűzés

Ebben a munkában azt vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a HANO-C1-INH súlyossága és az in vivo képződött komplementaktivációs paraméterek között, különös tekintettel C1rC1sC1-INH komplexre. Ezen kívül elemeztük fenti markerek lehetséges prediktív értékét a kórkép súlyosságát illetően. Mivel a betegek jelentős része a gondozásuk során részesül hosszú távon alkalmazott attenuált androgén hatású kezelésben, amely a komplementszintekre is hatással van (25), az elemzésbe bevontuk a már terápiában részesülő betegeket is.

Betegek és módszerek

Vizsgált egyének

Vizsgálatunkba az Országos HANO Központban nyomon követett HANO-C1-INH betegek közül 105 főt (95 fő I-es típus, 10 fő II-es típus) (48 férfi és 57 nő, min.-max. kor

5–75 év [medián: 31 év]) vontunk be. A HANO-C1-INH diagnózisát a nemzetközi ajánlások alapján, a klinikai kritériumok (családtörténet, visszatérő angiooedémás epizódok subcutan és/vagy submucosus lokalizációban) és a komplementparaméterek vizsgálata (csökkent antigenikus és funkcionális C1-INH-szint, valamint csökkent C4-szint) alapján állítottuk fel (1). A vérvételt követő évben tapasztalt rohamok lokalizációjára és frekvenciájára vonatkozó klinikai adatokat, a kezelés típusát és dózisát, valamint a laboratóriumi értékeket az éves kontrollvizsgálat során az Országos HANO Regiszterben rögzítettük.

Hosszú távú megelőző kezelésként danazol (attenuált androgén) és tranexámsavat (antifibrinolitikum) alkalmaztunk, míg az oedémás rohamokat emberi plazmából előállított C1-INH koncentráttal (Beriner P®) kezeltük.

Az egészséges kontrollcsoportot 94 fő alkotta (35 férfi, 59 nő; medián életkor: 57 év), akik menedzserszerűen vettek részt. Minden beteg és kontrollszemély írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz, illetve a vizsgálat Etikai Bizottsági engedélyeztetés alapján történt.

Az egészséges kontrollok és a betegek tünetmentes időszakban levett szérum és EDTA-plazma mintáit felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Akut kezelés C1-INH koncentráttal

C1-INHcc-t alkalmaztunk, amennyiben oedema jelentkezett a felső légutak nyálkahártyáján, mivel ez fulladáshoz vezethet. Akut kezelést vezetünk be továbbá, ha a roham az arcon, ajakon, vagy nyakon jelentkezett, mivel az említett lokalizációkból könnyen átterjedhet a felső légutakra, életveszélyes állapothoz vezetve. A közepes, illetve súlyos gastro-intestinalis oedemát is C1-INHcc-vel kezeltük, az akut klinikai tünetek (görcsös hasi fájdalom, hányinger, hányás, hasmenés) enyhítése érdekében. Súlyos, a törzset, illetve a nemi szerveket érintő, valamint fájdalmas végtagi oedema esetén is ezt a típusú kezelést alkalmaztuk. Minden, az Országos HANO Központban gondozott beteg magánál tart két ampulla C1-INHcc-t, így az akut kezelés mindig a betegek rendelkezésre áll.

A HANO-C1-INH súlyosságának megítélése

A vérvételt követő évben átélt oedémás rohamok súlyosságát, lokalizációját, lefolyását, valamint az alkalmazott kezelés típusát betegeink folyamatosan rögzítették a kiadott betegnaplókban. A vizsgálatba bevont 105 beteg a vérvételt követő évben összesen 782 rohamról számolt be (5 [0–8]; medián [25–75. percentilis]), közülük 528 volt subcutan lokalizációjú, 213 hasi és 41 felső légúti. A rohamok száma egyénenként legfeljebb 64 volt. A betegeket két csoportra osztottuk a rohamok száma alapján, az évi 0–8 rohamot átélő betegek tartoztak az „enyhe” csoportba. Minden súlyos oedémás rohamot C1-INHcc-vel kezeltünk, így a vizsgálati év alatt felhasznált C1-INHcc számát a körkép súlyossági markerének tekintettük. A vérvételt követő évben 23/105 beteg összesen 54 ampulla C1-INHcc-t kapott (0 [0–1]; medián [25–75. percentilis]), 51 oedémás roham kezelésére (1–2 ampulla epizódonként). A legtöbb, egy beteg által felhasznált mennyiség 10 ampulla volt.

A betegeket két csoportra osztottuk a felhasznált C1-INH ampullák száma alapján, így „kezelt”: ≥ 1 , illetve „nem kezelt”: = 0 csoportra.

Komplementparaméterek és aktivációs termékek meghatározása

A klasszikus (C1rC1sC1-INH), az alternatív (C3bBbP) és a terminális út (SC5b-9) aktivációs termékeit a korábban beállított és közölt házi ELISA módszerekkel határoztuk meg, EDTA-plazmában (26).

A funkcionális C1-INH-szintet kereskedelmi ELISA kittel (Quidel, USA), míg a C4-koncentrációt radiális immundiffúzióval, poliklonális anti-human C4c ellenanyag (Dako, Denmark) felhasználásával, szérum mintákban határoztuk meg.

Statisztikai elemzések

Statisztikai elemzéseinket a Prism v4.00 programmal (GraphPad Software, San Diego California, USA) végeztük el. Mann–Whitney teszttel két független csoportot hasonlítottunk össze, míg Spearman-féle Rho tesztet alkalmaztuk korrelációk kiszámítására. A Fisher teszttel hasonlítottunk össze kategorikus változókat. Minden statisztikai elemzésnél a $p < 0,05$ értéket tartottuk statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Komplementparaméterek HANO-C1-INH betegekben és egészséges kontrollokban

Tünetmentes HANO-C1-INH betegek és egészséges kontrollok vérében megvizsgáltuk a komplementaktivációs termékek (C1rC1sC1-INH, C3bBbP, SC5b-9) szintjét. A betegek mintáit megvizsgálva kb. 10-szer magasabb C1rC1sC1-INH-koncentrációt tapasztaltunk, az egészséges személyekhez viszonyítva (32,8 AU/ml [18,2 AU/ml–50,7 AU/ml] vs. 3,4 AU/ml [2,8 AU/ml–3,9 AU/ml]; $p < 0,0001$). A C1rC1sC1-INH-szint hasonló volt az I-es és II-es típusú betegeket összehasonlítva (35,0 AU/ml [20,3 AU/ml–56,0 AU/ml]) vs. 26,6 AU/ml [17,5 AU/ml–33,9 AU/ml]). A C3bBbP és SC5b-9 szintek tekintetében nem találtunk különbséget a betegek és a kontrollok között.

Megvizsgálva, hogy van-e különbség a danazzal kezelt, illetve nem kezelt betegek között a komplementaktivációs paraméterek tekintetében, csak az SC5b-9-szintek mutattak különbséget. A terminális komplex szintje alacsonyabb volt a danazzal nem kezelt betegekben, mint a kezeltben (1,6 AU/ml [0,8 AU/ml–2,1 AU/ml] vs 2,1 AU/ml [1,9 AU/ml–2,7 AU/ml]; $p = 0,0016$), illetve az egészséges kontrollokban (1,8 AU/ml [1,3 AU/ml–2,5 AU/ml]; $p = 0,0283$) (1. ábra).

A komplementparaméterek közötti összefüggések vizsgálata 105 HANO-C1-INH betegben

Elemztük, hogy van-e összefüggés a komplementaktivációs termékek szintje és a HANO-C1-INH diagnózisában felhasznált paraméterek (funkcionális C1-INH és C4) koncentrációja között. Szignifikáns korrelációt találtunk a C1rC1sC1-INH és a funkcionális C1-INH ($r = -0,4853$, $p < 0,0001$), valamint a C4 ($r = -0,3573$, $p = 0,0002$) között. A C3bBbP koncentráció negatív korrelációt mutatott a funkcionális C1-INH szintjével ($r = -0,3067$, $p = 0,0015$), de nem találtunk összefüggést a C1rC1sC1-INH, illetve C4 szintekkel. Az alternatív (C3bBbP), illetve terminális (SC5b-9) komple-

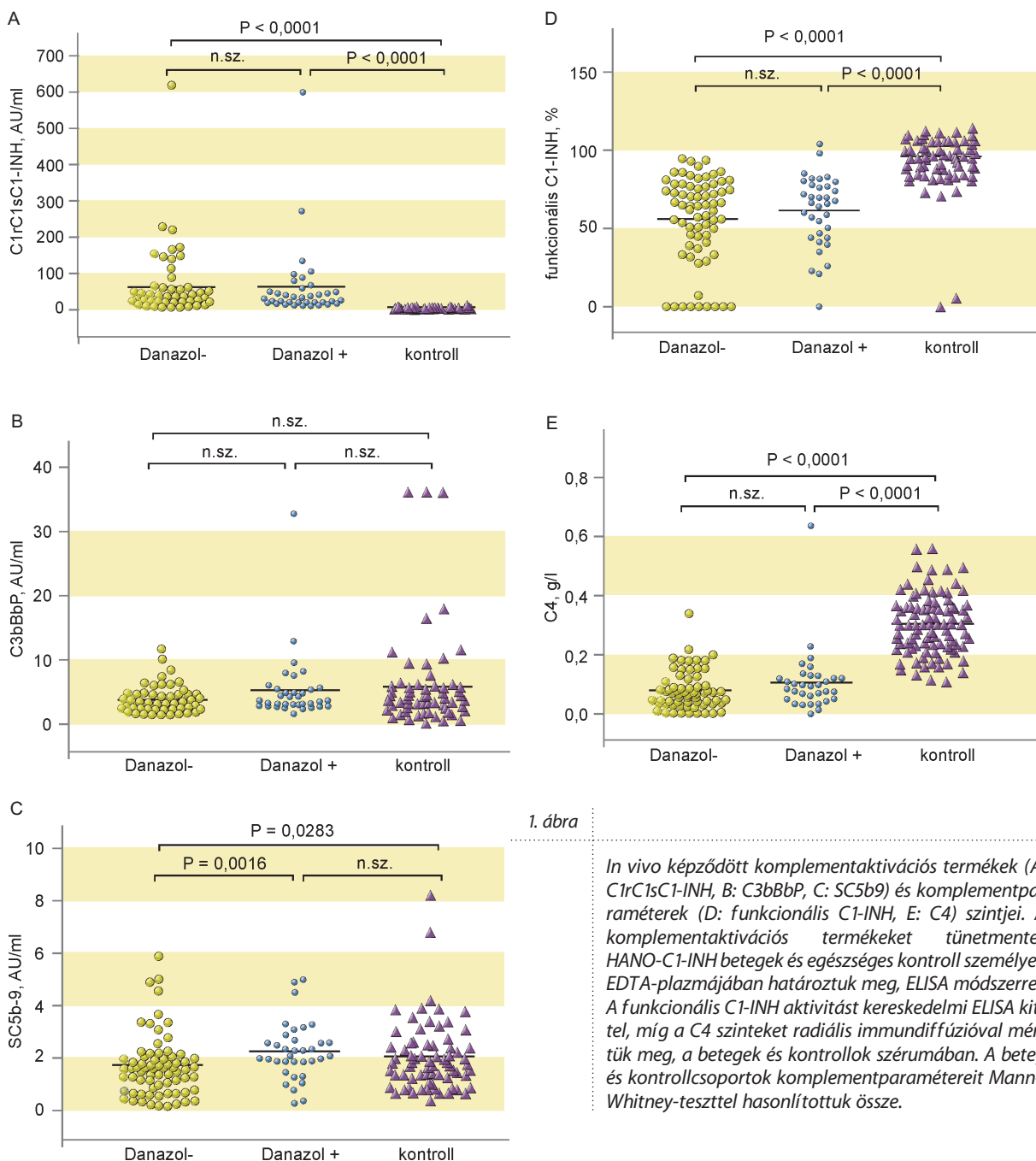
mentaktiválódás paramétereit szignifikáns korrelációt mutatnak egymással ($r=0,4197$, $p<0,0001$).

Összefüggés a komplementaktivációs szintek és a betegség súlyossága között

Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a C1rC1sC1-INH-szintek és a vérvételt követő évben tapasztalt rohamszám között. A funkcionális C1-INH- és C4-szintek is szignifikáns, negatív korrelációt mutatnak a rohamszámmal. Amennyiben a legsúlyosabb rohamokat vettük figyelembe (melyek számát az évente felhasznált C1-INHcc mennyisége pontosan jelezte), még erősebb összefüggéseket találtunk a

C1rC1sC1-INH, funkcionális C1-INH- és C4-szintekkel. A C3bBbP- és SC5b-9-szintek sem az éves rohamszámmal, sem a felhasznált C1-INHcc mennyiségével nem mutattak összefüggést (1. táblázat).

A fenti összefüggések elemzését leszűkítettük arra a betegcsoportra (44 fő), akik folyamatos danazol terápiában részesültek a vérvétel évében, és az azt követő évben is. Az éves rohamszám szignifikánsan korrelált a C1rC1sC1-INH-koncentrációval és markáns negatív korrelációt mutatott a C4- és funkcionális C1-INH-szintekkel. A vérvételt követő évben felhasznált C1-INHcc száma a funkcionális C1-INH-szinttel mutatta a legerősebb összefüggést, de szignifikáns korrelációt tapasztaltunk a C1rC1sC1-INH- és C4-szintek tekintetében is



1. ábra

In vivo képződött komplementaktivációs termékek (A: C1rC1sC1-INH, B: C3bBbP, C: SC5b9) és komplementparaméterek (D: funkcionális C1-INH, E: C4) szintjei. A komplementaktivációs termékeket tünetmentes HANO-C1-INH betegek és egészséges kontroll személyek EDTA-plazmájában határoztuk meg, ELISA módszerrel. A funkcionális C1-INH aktivitást kereskedelmi ELISA kittel, míg a C4 szinteket radiális immundiffúzióval mértük meg, a betegek és kontrollok szérumban. A beteg és kontrollcsoportok komplementparamétereit Mann-Whitney-teszttel hasonlítottuk össze.

1. táblázat

Korrelációk a komplement paraméterek és éves rohamszám, illetve a súlyos rohamok kezelésére felhasznált C1-INHcc mennyisége között, 105 HANO-C1-INH betegben. A C1-INHcc száma a vérvételt követő évben tapasztalt fogyasztást mutatja.

KOMPLEMENT-PARAMÉTEREK	ÉVES ROHAMSZÁM	C1-INHCC SZÁMA
C1rC1sC1-INH, AU/ml	0,363* (<0,001)	0,421 (<0,001)
C3bBbP, AU/ml	0,110 (0,268)	0,134 (0,178)
SC5b9, AU/ml	0,070 (0,479)	0,018 (0,858)
C1-INH aktivitás, %	-0,347 (<0,001)	-0,269 (0,006)
C4, g/l	-0,209 (0,037)	-0,204 (0,043)

2. táblázat

Korrelációk a komplement paraméterek és a betegség súlyossági markerek között, 44 danazollal kezelt HANO-C1-INH betegben. A betegség súlyosságát alábbi két markerrel jellemeztük:
1) a vérvételt követő évben tapasztalt összrohamszám és
2) a súlyos angiooedémás rohamok kezelésére alkalmazott C1-INHcc száma, a vérvételt követő évben.

KOMPLEMENT-PARAMÉTEREK	ÉVES ROHAMSZÁM	C1-INHCC SZÁMA
C1rC1sC1-INH, AU/ml	0,367* (0,014)	0,332 (0,027)
C1-INH aktivitás, %	-0,402 (0,006)	-0,404 (0,006)
C4, g/l	-0,549 (<0,001)	-0,335 (0,034)

* Spearman korrelációs koefficiens (p-érték)

(2. táblázat). További vizsgált komplementaktivációs markerek (C3bBbP és SC5b-9) sem az éves rohamszámmal, sem a felhasznált C1-INHcc számával nem mutattak összefüggést a danazollal kezelt betegekben.

A HANO-C1-INH súlyosságának prediktív markerei

A tapasztalt összefüggések alapján megvizsgáltuk, hogy a fenti komplementparaméterek mérését fel lehet-e használni a betegség súlyosságának (éves rohamszám, illetve felhasznált C1-INHcc száma a vérvételt követő évben) előrejelzésére. A betegeket a medián C1rC1sC1-INH szint (32,8 AU/ml) alapján két csoportra osztva azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan több súlyos beteg (magas rohamszám) tartozik a magas C1rC1sC1-INH szinttel jellemzett csoportba, mint az alacsony koncentrációval rendelkezők közé (17/50 vs. 7/53). Amennyiben a felhasznált C1-INHcc számával jellemeztük a betegség súlyosságát, hasonló eloszlást találtunk: a magasabb C1rC1sC1-INH szinttel jellemzett csoportba szignifikánsan több akut kezelést igénylő beteg tartozott (19/50 vs. 4/53).

Ha a betegeket a medián funkcionális C1-INH-szint (66%) alapján osztottuk két csoportra, hasonló, szignifikáns

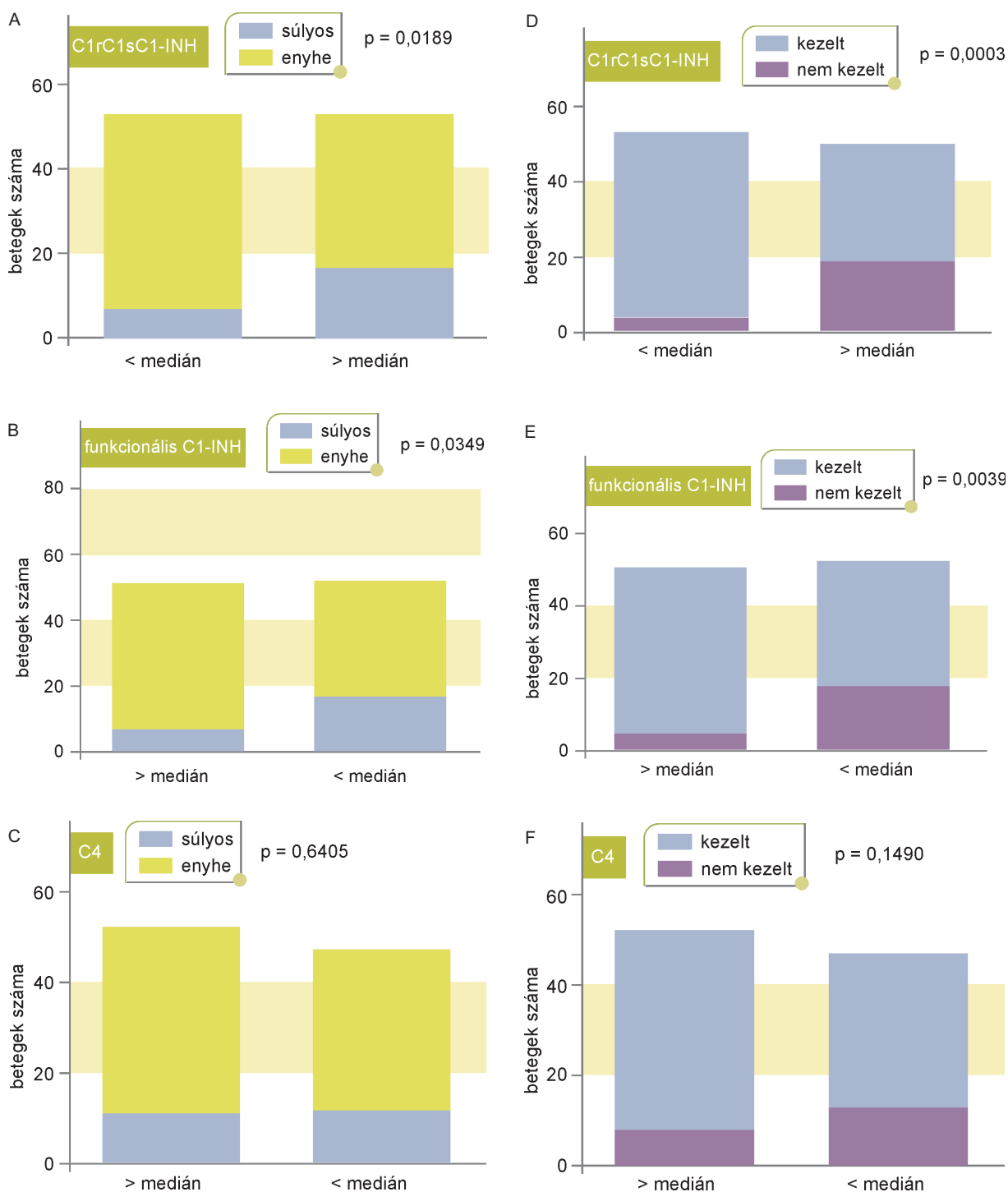
különbséget tapasztaltunk a súlyos, illetve enyhe betegek megoszlásában a C1-INHcc-val kezelt, illetve nem kezelt csoportok között. Az alacsony C1-INH-szinttel jellemzett csoportba 17/52 súlyos, míg a magas C1-INH koncentrációjú csoportba csupán 7/51 súlyos beteg tartozott. A C1-INHcc-val kezelt betegek megoszlása 18/52 vs. 5/51 volt az alacsony, illetve magas C1-INH-szinttel rendelkező csoportok között.

Ha a betegeket a medián C4-szint (0,07 g/l) alapján osztottuk két csoportra, nem tapasztaltunk különbséget a súlyos betegek megoszlásában a két csoport között, sem a rohamszámot, sem az alkalmazott C1-INHcc számát figyelembe véve (2. ábra).

A fenti összefüggéseket többszörös logisztikus regresszióval, korra, nemre és a HANO-C1-INH típusára adjusztálva azt tapasztaltuk, hogy a magas C1rC1sC1-INH szinttel rendelkező betegek >4-szer nagyobb eséllyel tapasztalnak >8 rohamot évente. Amennyiben a felhasznált C1-INHcc mennyiségét vettük figyelembe, még érdekesebb összefüggést tapasztaltunk: a magas C1rC1sC1-INH-szinttel rendelkező betegek 12-szer nagyobb eséllyel szorulnak C1-INHcc-val történő kezelésre, mint a medián alatti C1rC1sC1-INH szinttel rendelkező társaik. Fenti elemzéseket elvégeztük a medián funkcionális C1-INH, illetve C4 szintek alapján is: a csökkent funkcionális C1-INH szint magasabb rohamszámot, valamint magasabb C1-INHcc fogyasztást jelzett előre, míg az adjusztálást követően a C4-szintet nem találtuk prediktív értékűnek (3. táblázat). A C1rC1sC1-INH- és a funkcionális C1-INH-szintek igen erősen prediktív értékűnek bizonyultak a leggyakoribb rohamtípus, a subcutan rohamok számát illetően (C1rC1sC1-INH: adjusztált Odds ratio =2,87 [1,05–7,86]; p=0,04 továbbá funkcionális C1-INH: adjusztált odds ratio =3,55 [1,26–10,00]; p=0,017).

Megbeszélés

A hereditaer angiooedema tüneteinek súlyossága kiszámíthatatlanul, időről-időre változhat, ezért egy olyan objektív laboratóriumi markert kerestünk, amely segíti a kezelő orvost a körkép súlyosságának megítélésében. A medián C1rC1sC1-INH-szint 10-szer magasabb volt HANO-C1-INH betegekben, az egészséges kontrollokhoz képest. Ez az eredményünk összhangban van *Cugno és munkatársai* korábbi munkájával, amelyben 2-szer magasabb C1rC1sC1-INH-szintről számoltak be HANO-C1-INH betegekben (eredményeik kevésbé szenzitív módszeren alapultak, ami magyarázhatja a különbséget) (19). A C3bBbP és SC5b-9 szintek tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és a kontrollok között. Bár az alternatív komplement útvonal aktivációs markere korrelációt mutatott a funkcionális C1-INH-szinttel, a komplementaktiválódás C3 fehérjén túli lépései valószínűleg nem bírnak fontos szereppel a HANO-C1-INH patomechanizmusában, tünetmentes betegekben. Szignifikáns korrelációt találtunk a C1rC1sC1-INH komplex, funkcionális C1-INH- és C4-szintek, valamint a HANO-C1-INH súlyosságát jelző paraméterek (éves rohamszám, illetve a súlyos rohamok akut kezelésére felhasznált C1-INHcc száma) között, a danazollal kezelt csoportban is. Elsőként írtuk le, hogy mind a C1rC1sC1-INH-, mind a funkcionális C1-INH-szint prediktív értékű lehet a betegség súlyosságának megítélésében, figyelembe véve a vérvételt követő évben tapasztalt oedémás rohamok számát és a felhasznált C1-INHcc mennyiségét. Eredményeinket, a C1rC1sC1-INH diagnosztikus értékét illetően *Nielsen és munkatársai* közleménye is alátámasztja, melyben leírták, hogy bizonyos komplementaktiv-



2. ábra

Súlyos, illetve enyhe (rohamszám, illetve az elfogyasztott C1-INHcc alapján) HANO-C1-INH betegek megoszlása az egyes komplement paraméterek medián szintjei alapján képzett csoportokban. A betegeket két csoportra osztottuk az éves rohamszám alapján (>8 roham, azaz „súlyos” vs. <8 roham, azaz „enyhe”). Ezt követően, az így kapott alcsoportokat tovább bontottuk az egyes komplement paraméterek medián szintje alapján, és megvizsgáltuk a súlyos és enyhe esetek arányát (medián értékek: C1rC1sC1-INH: 32,8 AU/ml, funkcionális C1-INH: 66%, C4: 0,07 g/l). Fenti elemzést úgy is elvégeztük, hogy a betegeket az egy év alatt felhasznált C1-INHcc száma alapján osztottuk két csoportra (>0 azaz „kezelt” vs. =0 azaz „nem kezelt”). Elemzéseink során Fisher-tesztet használtunk.

3. táblázat

Összefüggés a komplementparaméterek és a rohamok gyakorisága között 105 HANO-C1-INH betegben. Többszörös logisztikus regresszióval adjusztáltunk a nemre, a betegek korára és a HANO-C1-INH típusára.

	MAGAS (>*8) VS. ALACSONY (≤8) ROHAM GYAKORISÁG		C1-INH _{CC} -VAL KEZELT VS. NEM KEZELT	
	OR (95% CI)	P-ÉRTÉK	OR (95% CI)	P-ÉRTÉK
C1rC1sC1-INH, AU/ml; magas (>medián**) vs. alacsony (<medián)	4,38 (1,43–13,43)	0,010	11,78 (2,54–54,67)	0,002
C1-INH aktivitás, %, alacsony (<medián**) vs. magas >medián)	3,09 (1,08–8,77)	0,035	4,83 (1,45–15,63)	0,008
C4, g/l, alacsony (<medián**) vs. magas (>medián)	1,62 (0,51–5,21)	0,416	1,52 (0,44–5,18)	0,509

* felső kvartilisben

** medián értékek az egyes paraméterekre: C1rC1sC1-INH: 32,8 AU/ml, funkcionális C1-INH aktivitás: 66%, C4: 0,07 g/l.

ciós markerek (C1rC1sC1-INH, C4bc, C4d, C3bc és C3a) szintje magasabb tünetmentes HANO-C1-INH betegekben az egészséges kontrollokhoz képest (21). Elemzésünk alapján a hereditár angiooedema tüneteinek súlyossága legalább egy évre előre megjósolható, ami nagy jelentőséggel bírhat a megfelelő, egyénre szabott terápia kialakításában. Munkánkban nem vizsgáltuk a nemek, illetve a HANO-C1-INH I-es és II-es típusa közötti lehetséges különbségeket, utóbbihoz nagyobb betegcsoportra és nemzetközi együttműködésre lenne szükség. Eredményeink jelentősége abban rejlik, hogy a korábbi tanulmányokhoz képest jelentősen nagyobb számú beteget vontunk be vizsgálatunkba, elemeztük a danazol hatását, és a folyamatos, több éves nyomon követés alapján lehetőséget kínálunk a betegek súlyosságának objektívabb megítélésére a klinikai és laboratóriumi paramétereik együttes kiértékelésével.

Konklúzió

Bár a bradikinin felelős az oedema képződéséért, a C1-INH csökkent szabályozó funkciója nagy jelentőséggel bír a HANO-C1-INH patomechanizmusában. A szabályozás csökkent mértéke közvetlenül kimutatható a C1rC1sC1-INH mennyiségi meghatározásával, hiszen a komplex létrejöttét közvetlenül gátolja a C1-INH. Elemzésünk szerint a C1rC1sC1-INH- és a funkcionális C1-INH-szintek eredmények lehetnek a várható éves rohamszám előrejelzésében egyénenként, még az attenuált androgén terápiaiban részesülő betegek esetében is. Az általunk leírt prediktív paraméterek segítséget nyújthatnak a betegek ellátásában, egy olyan körképben, amelyet változó súlyosságú, nehezen prediktálható szakok jellemeznek.

Irodalom

- Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, et al. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(3 Suppl):S51-131.
- Davis AE, 3rd. The pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Immunol.* 2005; 114(1):3-9. Epub 2004/12/15.
- Bork K. Recurrent angioedema and the threat of asphyxiation. *Deutsches Arzteblatt international.* 2010; 107(23):408-14. Epub 2010/07/01.
- Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *The American journal of medicine.* 2006; 119(3):267-74. Epub 2006/02/24.
- Frank MM, Gelfand JA, Atkinson JP. Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management. *Annals of internal medicine.* 1976; 84(5):580-93. Epub 1976/05/01.
- Blasko B, Szeplaki G, Varga L, Ronai Z, Prohaszka Z, Sasvari-Szekely M, et al. Relationship between copy number of genes (C4A, C4B) encoding the fourth component of complement and the clinical course of hereditary angioedema (HAE). *Mol Immunol.* 2007; 44(10):2667-74. Epub 2007/01/19.
- Agostoni A. Inherited C1 inhibitor deficiency. *Complement and inflammation.* 1989; 6(2):112-8. Epub 1989/01/01.
- Lung CC, Chan EK, Zuraw BL. Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 1997; 99(1 Pt 1):134-46. Epub 1997/01/01.
- Duponchel C, Djenouhat K, Fremaux-Bacchi V, Monnier N, Drouet C, Tosi M. Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of SERPING1/C1NH. *Human mutation.* 2006; 27(3):295-6. Epub 2006/02/14.
- Drouet C, Desormeaux A, Robillard J, Ponard D, Bouillet L, Martin L, et al. Metallopeptidase activities in hereditary angioedema: effect of androgen prophylaxis on plasma aminopeptidase P. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2008; 121(2):429-33. Epub 2007/12/26.
- Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L. Eradication of *Helicobacter pylori* and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet.* 2001; 358(9294):1695-6.
- Visy B, Fust G, Varga L, Szendei G, Takacs E, Karadi I, et al. Sex hormones in hereditary angioneurotic oedema. *Clinical endocrinology.* 2004; 60(4):508-15. Epub 2004/03/31.
- Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, et al. International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010; 6(1):24.
- Bork K, Bygum A, Hardt J. Benefits and risks of danazol in hereditary angioedema: a long-term survey of 118 patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 100(2):153-61. Epub 2008/03/07.
- Bork K, Hardt J. Hereditary angioedema: increased number of attacks after frequent treatments with C1 inhibitor concentrate. *The American journal of medicine.* 2009; 122(8):780-3. Epub 2009/07/29.
- Kelemen Z, Moldovan D, Mihaly E, Visy B, Szeplaki G, Csuka D, et al. Baseline level of functional C1-inhibitor correlates with disease severity scores in hereditary angioedema. *Clin Immunol.* 2010; 134(3):354-8. Epub 2009/12/01.

17. Joseph K, Tholanikunnel TE, Kaplan AP. Treatment of episodes of hereditary angioedema with C1 inhibitor: serial assessment of observed abnormalities of the plasma bradykinin-forming pathway and fibrinolysis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010; 104(1):50-4. Epub 2010/02/11.
18. Davis AE, 3rd. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annual review of immunology*. 1988; 6:595-628. Epub 1988/01/01.
19. Cugno M, Nuijens J, Hack E, Eerenberg A, Frangi D, Agostoni A, et al. Plasma levels of C1- inhibitor complexes and cleaved C1- inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *The Journal of clinical investigation*. 1990; 85(4):1215-20. Epub 1990/04/01.
20. Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1993; 121(1):38-43. Epub 1993/01/01.
21. Nielsen EW, Johansen HT, Gaudesen O, Osterud B, Olsen JO, Hogasen K, et al. C3 is activated in hereditary angioedema, and C1/C1-inhibitor complexes rise during physical stress in untreated patients. *Scand J Immunol*. 1995; 42(6):679-85. Epub 1995/12/01.
22. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, et al. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood*. 1997; 89(9):3213-8. Epub 1997/05/01.
23. Cugno M, Zanichelli A, Bellatorre AG, Griffini S, Cicardi M. Plasma biomarkers of acute attacks in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergy*. 2009; 64(2):254-7.
24. Cedzynski M, Madalinski K, Gregorek H, Swierzko AS, Nowicka E, Obtulowicz K, et al. Possible disease-modifying factors: the mannan-binding lectin pathway and infections in hereditary angioedema of children and adults. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2008; 56(1):69-75. Epub 2008/02/06.
25. Gelfand JA, Sherins RJ, Alling DW, Frank MM. Treatment of hereditary angioedema with danazol. Reversal of clinical and biochemical abnormalities. *N Engl J Med*. 1976; 295(26):1444-8.
26. Csuka D, Fust G, Farkas H, Varga L. Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clin Immunol*. 2011; 139(1):85-93. Epub 2011/02/09.

Nagyér-transzpozícióban az arteria carotis csökkent rugalmassága nem rontja a cardiovascularis autonóm funkciót

Reduced carotid artery distensibility does not impair cardiac autonomic function in patients with transposition of the great arteries

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés.* Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy teljes nagyér-transzpozícióban (TGA) a kóros szeptációhoz a centrális nagyerek rugalmasságának csökkenése társul. TGA-ban fellépő gyakori késői szövődmények az arrhythmiai és következményes hirtelen szívhalál (SCD), azonban mechanizmusuk nem ismert. A csökkent baroreflex-érzékenység (BRS) a SCD független prediktora, amelyet befolyásol a baroreceptor érterületek rugalmassága.

Célkitűzés. Megvizsgáltuk tehát, hogy (i) az a. carotis rugalmassága csökkent-e, (ii) a baroreflex funkciója sérült-e, és (iii) van-e összefüggés közöttük TGA-ban.

Módszerek. 32 Senning-műtött TGA beteget (13±3 év) és 32 korban és nemből egyeztetett kontrollalanyt vizsgáltunk. Meghatároztuk az a. carotis disztenzibilitási koefficiensét (DC) falmozgást követő ultrahanggal és tonometriával. A BRS-t EKG és vérnyomás regisztrátumokból spontán (BRS_{seq}) és farmakológiai (BRS_{phe}) módszerrel határoztuk meg.

Eredmények. A DC jelentősen alacsonyabb volt a betegcsoportban a kontrollcsoporthoz képest (5,6±1,9 vs. 8,7±2,7 10⁻³/Hgmm, páratlan t-teszt p<0,05), azonban a BRS nem különbözött a két csoportban (BRS_{seq}: 20,3±14,7 vs. 21,7±12,7 és BRS_{phe}: 19,1±8,6 vs. 24,8±7,2 ms/Hgmm). A DC és a BRS paraméterek között nem volt összefüggés.

Következtetések. Az a. carotis elasztikus funkciója károsodott TGA betegekben, ami a fejlődési rendellenesség részét képezheti. A merevebb baroreceptor érterület azonban nem eredményezte a baroreflex funkció sérülését. A születés óta fennálló csökkent baroreceptor-stimulust feltehetőleg kompenzálja a baroreflex kialakításában résztvevő központi idegrendszeri struktúrák plaszticitása.

KULCSSZAVAK teljes nagyér-transzpozíció, a. carotis, érfalrugalmasság, baroreflex-érzékenység

SUMMARY *Introduction.* Based on previous results, we hypothesized that abnormal septation in transposition of the great arteries (TGA) is associated with impaired elastogenesis of the great arteries. Stiffening of the elastic, barosensory carotid artery may result in decreased baroreflex-sensitivity (BRS). Reduced BRS is the predictor of sudden cardiac death, the main cause of postoperative mortality in TGA.

Aims. We investigated if (i) carotid artery distensibility is reduced (DC), (ii) BRS is decreased, and (iii) these two parameters are related in TGA.

Methods. 32 TGA patients (13±3 yrs) and 32 age-matched controls were examined. DC was determined by echo wall-tracking and tonometry. BRS indices were calculated from ECG and beat-to-beat blood pressure recordings with spontaneous (BRS_{seq}) and phenylephrine (BRS_{phe}) methods.

Results. DC was reduced in patients compared with controls (5,6±1,9 vs. 8,7±2,7 10⁻³/mmHg, unpaired t-test p<0,05), but BRS was not different between TGA and healthy subjects (BRS_{seq}: 20,3±14,7 vs. 21,7±12,7 and BRS_{phe}: 19,1±8,6 vs. 24,8±7,2 ms/mmHg). DC and BRS parameters were not related.

Conclusions. Carotid artery elasticity was markedly reduced in TGA, which may be part of the congenital abnormality. But stiffening of the barosensory vessel wall was not associated with reduced BRS. Neuronal plasticity of central baroreflex structures may compensate the congenitally existing reduced baroreceptor-input.

KEY WORDS transposition of the great arteries, carotid artery distensibility, baroreflex-sensitivity

Pintér Alexandra¹
Horváth Tamás¹
Kádár Krisztina²
Kollai Márk¹

¹Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, Budapest

²Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézet, Budapest

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Pintér Alexandra
Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet
1446 Budapest, Pf. 448.

E-mail:

pinter.alexandra@
med.semmelweis-univ.hu

Rövidítések

TGA	teljes nagyér-transzpozíció
BRS	baroreflex-érzékenység
BRS _{phc}	farmakológiai módszerrel meghatározott baroreflex-érzékenység
HRV	szívfrekvencia-variabilitás
IMT	carotis intima–media vastagság
D	carotis végdiastolés átmérő
ΔD	carotis pulzatilis disztenzió
ΔP	carotis pulzusnyomás
DC	carotis disztenzibilitási koefficiens
Einc	carotis inkrementális elasztikus modulus
LCSA	carotis lumen keresztmetszeti területe
IMCSA	az intima–media keresztmetszeti területe
RRI	RR-intervallum
BMI	testtömegindex
SBP	brachialis systolés nyomás
DBP	brachialis diastolés nyomás
MBP	brachialis átlagnyomás
HR	szívfrekvencia
SDNN	a normál RR-intervallumok standard deviációja
RMSSD	a szomszédos RR-intervallumok különbségének a négyzet-összegének átlaga majd ennek a négyzetgyöke
pNN50	azon RR-intervallumoknak a százalékos aránya, amelyek az előzőtől legalább 50 ms-mal különböznek
LF	a HRV alacsony frekvenciájú (0,05–0,15Hz) teljesítménysűrűsége
HF	a HRV magas frekvenciájú (0,15–0,4 Hz) teljesítménysűrűsége
BRS _{seq}	szekvenciális spontán módszerrel meghatározott baroreflex-érzékenység
BRS _{spectral}	spektrális spontán módszerrel meghatározott baroreflex-érzékenység

Bevezetés

A teljes nagyér-transzpozíció (TGA) súlyos szívfejlődési rendellenesség, amelynek lényege, hogy az aorta a jobb, az arteria pulmonalis a bal kamrából ered. A rendellenesség fejlődési alapja az abnormális aorticopulmonalis szeptáció. Csirkeembriókban kimutatták, hogy ugyanazon dúlcél eredetű sejtek indukálják a kamrai és aorticopulmonalis szeptációt, amelyek felelősek a centrális nagyartériák elasztikus lamelláinak szintéziséért (1, 2). Feltehetőleg humán embrióban is hasonló folyamatok játszódnak le, erre közvetett bizonyítékul szolgálhatnak azok a szövettani vizsgálatok, amelyek fragmentálódott elasztikus rostokat, csökkent elasztin–kollagén arányt mutattak ki a centrális artériák falában egyes, károsodott szeptációval járó szívfejlődési rendellenességek esetében (3). Feltételeztük tehát, hogy a centrális elasztikus artériák merevbbek szeptációs rendellenességgel járó congenitalis vitiumokban. Ezen előzmények alapján kérdésünk az volt, hogy (i) csökkent-e az arteria carotis mint elasztikus ér rugalmassága TGA-betegekben.

A korai életszakaszban elvégzett pitvari switch műtétet követően a TGA-val született betegek életkilátásai jók, de az operációt követően számottevő (5,3–9,6%), főként arrhythmia eredetű mortalitással kell számolniuk 20 éven belül (4). A myocardium elektromos instabilitásának okai nem pontosan ismertek. Egy esetleges autonóm idegrendszeri egyensúly-eltolódás a szimpatikus idegrendszer irányába szerepet játszhat az arrhythmiai kialakulásában. Ismert, hogy a cardialis autonóm funkciót meghatározó baroreflex-funkció károsodása független rizikófaktora a késői arrhythmia eredetű halálozásnak egy másik komplex szívfejlődési rendellenességben, Fallot-tetralógiában (5).

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a baroreflex funkcióját egészségesekben 50%-ban az arteria carotis rugal-

massága határozza meg (6). A baroreceptor érterületek, így az arteria carotis elasztikus funkciójának károsodása feltehetőleg ronthatja a baroreflex működését.

Ezen előzmények alapján további kérdéseink: (ii) csökkent-e a baroreflex-érzékenységgel (BRS) és szívfrekvencia-variabilitással (HRV) jellemezhető cardialis autonóm idegrendszeri aktivitás TGA-ban és (iii) a BRS-t meghatározza-e az arteria carotis rugalmassága ezen betegcsoportban.

Alanyok és módszerek

32 beteget vizsgáltunk (23 fiú, 9 lány, 9–19 év közöttiek). A betegek fél- és hároméves koruk közt pitvari switch operáción (Senning-műtét) estek át, a műtét óta eltelt átlagos idő 12±3 év. A betegeket a Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézetben gondozzák. A betegek klinikailag a NYHA I. funkcionális csoportba tartoztak, nem szorultak gyógyszeres kezelésre. A kizárási kritériumok közé tartoztak: arrhythmiai, az elmúlt két hónapban klinikai állapotromlás, magas vérnyomás. A betegek eredményeit korban és nemben egyeztetett kontrollok eredményeivel hasonlítottuk össze.

A vizsgálat alanyai (kiskorú esetén a szülő/gondviselő is) a részletes tájékoztatás után írásos beleegyezést adtak a vizsgálatához. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (207/2003).

Az arteria carotis ultrahangos vizsgálata: az arteria carotis communis tágulékenységének meghatározásához az ér átmérőjét, pulzatilis disztenzióját és hátsó falának intima-media vastagságát (IMT) vagy pontosságát (~10–20 μm), automatikus, falmozgást követő ultrahangos módszerrel határoztuk meg. A rendszer hagyományos ultrahangkészülékből és ehhez kapcsolt speciális szoftverből áll (7).

Az arteria carotis vérnyomás: az arteria carotis nyomáshullámát applanációs tonométerrel regisztráltuk. A tonometriás jel kalibrációjához az átlag- és diastolés vérnyomásértékeket a jobb arteria brachialisson sphygmomanométerrel mértük (8).

Az arteria carotis rugalmassági paramétereit: az érfalrugalmasság jellemzésére a regisztrált végdiastolés átmérő (D), érátmérő-változás (ΔD), IMT és carotis pulzusnyomás (ΔP) alapján az alábbi érfalrugalmassági paramétereket számoltuk³.

A disztenzibilitási koefficiens (DC) az érlumen térfogatának relatív változása egységnyi vérnyomásváltozás hatására. Képlete: $DC = 2 \cdot (\Delta D / D) / \Delta P [10^{-5}/\text{Hgmm}]$.

Az érfal rugalmas ellenállását a vérnyomás disztendáló hatásával szemben az inkrementális elasztikus modulus (Einc) jellemzi. Képlete: $Einc = [3 \cdot (1 + LCSA/IMCSA)] / DC [1/\text{Hgmm}]$, ahol $LCSA = \pi(D^2)/4$ a carotis lumen keresztmetszeti területe, $IMCSA = \pi(D/2 + IMT)^2 - \pi(D/2)^2$ az intima-media keresztmetszeti területe.

Baroreflex-érzékenység: a vérnyomás spontán fluktuációját követő szívfrekvencia-válaszok elemzése céljából 10 perces EKG-felvételt készítettünk végtagi elvezetésben, és simultán vérnyomást regisztráltunk ütészről ütésre tonometriás módszerrel az arteria radialison. Ezalatt a betegek légzésfrekvenciáját metronómmal harmonizáltuk (0,25 Hz). A BRS szekvenciális indexének számításához speciális szoftver a systolés nyomás (SBP) és RR-távolságok (RRI) tachogramjának elkészítése után kiválasztotta azokat a szekvenciákat, ahol az SBP és az RRI legalább három egymást követően ütésenként emelkedik. Az vérnyomás-emelkedésekhez tartozó RR-távolságokat függvényben ábrázoltuk, a pontokra

illesztett lineáris regressziós egyenes meredeksége adta meg a baroreflex-érzékenységet (BRS_{seq}). A BRS spektrális indexének meghatározásához az SBP és RRI teljesítményspektrumait használtuk. A $BRS_{spectral}$ -t a keresztispektrum transzfer-funkciójaként definiáltuk az alacsony frekvenciás (0,05–0,15 Hz) tartományban (10).

A BRS -t farmakológiai módszerrel is meghatároztuk. 18 beteg és 18 kontrollalany esetében intravénás phenylephrin bólus injekciót ($3-4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) adtunk, amely alfa-1-agonista-ként 15–25 Hgmm-rel megemeli a systolés vérnyomást. Az alanya jellemző BRS_{phe} -t a BRS_{seq} -hoz hasonlóan számítottuk¹¹.

Szívfrekvencia-variabilitás: a HRV-indexeket a 10 perces EKG-regisztrátumból készített RR-távolságok tachogramjából speciális szoftver számította. Az időtartományban meghatározott paraméterek a következők voltak: SDNN – a normál RRI-k standard deviációja; RMSSD – a szomszédos RRI-k különbségének a négyzetösszegének átlaga, majd ennek a négyzetgyöke; pNN50 – azon RRI-k százalékos aránya, amelyek az előzőtől legalább 50 ms-mal különböznek. Frekvenciatartományban az LF és HF – az RRI teljesítményspektrumának alacsony (0,05–0,15 Hz), illetve magas (0,15–0,4 Hz) frekvenciájú komponense – került meghatározásra (12).

Statisztikai elemzés: az adatokat átlag \pm SD formában adtuk meg. A beteg- és kontrollcsoport mutatóiban mutatkozó különbséget páratlan t-próbával vagy – amennyiben az adatok nem normál eloszlást mutattak – Mann–Whitney-tesztel hasonlítottuk össze. Az érfalrugalmassági mutatók életkorral és vérnyomással való összefüggését lineáris regresszióval vizsgáltuk. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ különbségeket tekintettük.

Vizsgálati protokoll: a vizsgálatok kora délután, étkezés után 3-4 órával történtek. A vizsgálat csak akkor kezdődhetett, ha az alany vérnyomás- és szívfrekvencia-paraméterei stabilizálódtak. Elsőként a jobb oldali carotison tonometriás módszerrel nyomásgörbét, a bal oldali carotison szinkron átmérőgörbét vettünk fel ultrahanggal. Ezután vezérelt légzés mellett EKG és radialis artériás vérnyomás felvételt készítettünk, amit a HRV- és spontán BRS -indexek számításához használtunk. Végül az alanyok egy részénél farmakológiai módszerrel is meghatároztuk a BRS -t.

Eredmények

A beteg- és kontrollcsoport klinikai paramétereit az 1. táblázatban tüntettük fel. A TGA-betegek testtömegindexe alacsonyabb volt a kontrollcsoportéhoz képest. A brachialis systolés nyomás szignifikánsan magasabb volt, a diastolés nyomás pedig alacsonyabb, ami magasabb pulzusnyomást eredményezett (54 ± 8 vs. 39 ± 10 Hgmm), de az átlagvérnyomás értékekben nem volt különbség.

Az arteria carotis dimenziót, elasztikus paramétereit a 2. táblázatban foglaltuk össze. Az arteria carotis végdiastolés átmérője szignifikánsan kisebb volt, a pulztilis disztenzió a magasabb carotis pulzusnyomás ellenére szintén kisebb volt. Az IMT szignifikánsan nagyobbak bizonyult a betegekben a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. A érfal-rugalmassági paraméterek az arteria carotis jelentős mértékű rugalmasságcsökkenését jelezték. Életkor előrehaladtával a DC mindkét csoportban csökkent, míg az Einc növekedett ($r = -0,36$ $r = 0,32$ a betegcsoportban, $r = -0,67$ $r = 0,79$ a kontrollcsoportban, $p < 0,05$). A DC és az Einc a systolés vérnyomással szignifikáns inverz, illetve pozitív összefüggést mutatott ($r = -0,60$ $r = 0,55$ a betegcsoportban, $r = -0,60$ $r = 0,60$ a kontrollcsoportban, $p < 0,05$). Az IMT és az érfal-rugalmassági mutatók között nem

1. táblázat

A TGA-betegek és kontrollalanyok klinikai adatai		
	TGA (SENNING-MŰTÖTT)	KONTROLL
n (lány)	32 (9)	32 (9)
életkor (év)	13,2 \pm 3,0	13,1 \pm 2,8
BMI (kg/m ²)	18,3 \pm 3,0*	20,4 \pm 1,6
SBP (Hgmm)	115 \pm 10*	105 \pm 12
DBP (Hgmm)	62 \pm 7*	66 \pm 9
MBP (Hgmm)	79 \pm 7	79 \pm 9
HR (ütés/min)	75 \pm 12	78 \pm 11

BMI – testtömegindex; SBP – brachialis systolés nyomás; DBP – brachialis diastolés nyomás; MBP – brachialis átlagnyomás; HR – szívfrekvencia.

Az adatok átlag \pm SD formátumban vannak feltüntetve. Páratlan t-próba vagy nem normál eloszlás esetén Mann–Whitney teszt * szignifikáns különbség a kontrollhoz képest, ahol $p < 0,05$

volt összefüggés a betegcsoportban, azonban a kontrollcsoportban az Einc szignifikáns, inverz kapcsolatot mutatott az IMT-vel ($r = -0,38$ $p < 0,05$).

A spontán BRS - és HRV-indexek nem mutattak szignifikáns különbséget a beteg- és a kontrollcsoport között (3. táblázat). A spontán BRS -indexek nem mutattak összefüggést a carotis rugalmassági paramétereivel, sem a kontroll-, sem a betegcsoportban. A 18 beteg és 18 kontroll esetében a farmakológiai módszerrel meghatározott BRS_{phe} betegekben ($19,1 \pm 8,6$ ms/Hgmm) kisebbnek bizonyult, mint a kontrollcsoportban ($24,8 \pm 7,2$ ms/Hgmm), de a különbség nem érte el a statisztikai szignifikanciaszintet. A kontrollcsoportban a BRS_{phe} és a carotis disztenziibilitása szignifikáns összefüggést mutatott ($r = 0,73$, $p < 0,05$) (1. ábra). A betegcsoport esetében a BRS_{phe} és a disztenziibilitás között nem volt összefüggés. A betegek adatait a kontroll BRS_{phe}-carotis disztenziibilitás függvényébe beillesztve, láthatóvá válik, hogy 10 TGA-beteg

2. táblázat

Az a. carotis pulzusnyomása, dimenziói és elasztikus paraméterei TGA-betegekben és kontrollokban		
	TGA (SENNING-MŰTÖTT)	KONTROLL
ΔP (Hgmm)	47 \pm 11*	36 \pm 10
D (μm)	5647 \pm 425*	5993 \pm 510
ΔD (μm)	698 \pm 142*	876 \pm 163
IMT (μm)	546 \pm 68*	478 \pm 51
DC (10^{-3} /Hgmm)	5,6 \pm 1,9*	8,7 \pm 2,7
Einc (1/Hgmm)	2,1 \pm 0,8*	1,5 \pm 0,6

ΔP – carotis pulzusnyomás; D – végdiastolés átmérő; ΔD – pulztilis disztenzió; IMT – intima-media falvastagság; DC – disztenziibilitási koefficiens; Einc – inkrementális elasztikus modulus.

Az adatok átlag \pm SD formátumban vannak feltüntetve. páratlan t-próba, vagy nem normál eloszlás esetén Mann–Whitney-teszt* szignifikáns különbség a kontrollhoz képest, ahol $p < 0,05$

3. táblázat

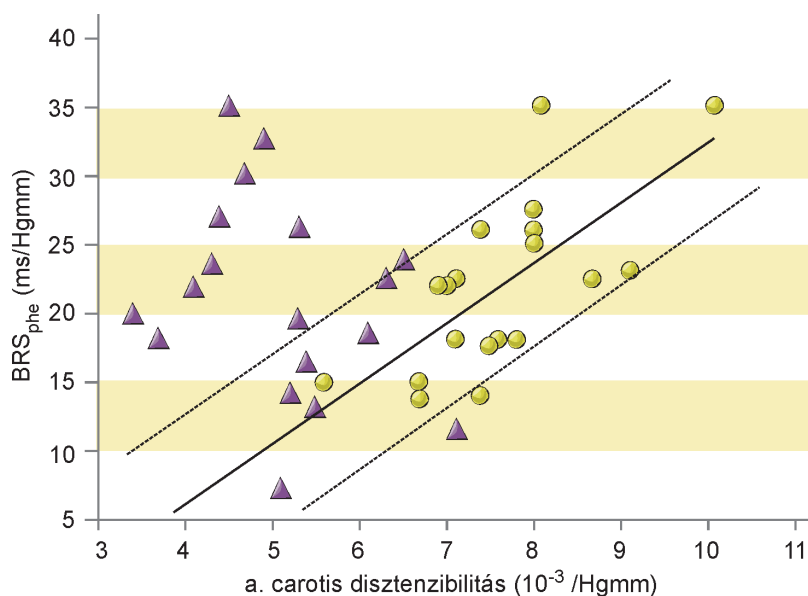
TGA betegek és kontroll alanyok HRV és spontán BRS indexei

	TGA (SENNING-MŰTÖTT)	KONTROLL
SDNN (ms)	77,3±39,6	66,6±25,0
RMSSD (ms)	76,2±55,7	61,5±37,7
pNN50 (%)	28,7±21,3	27,3±21,4
LF [ms ²]	1733±1560	1029±679
HF (ms ²)	2027±2620	1625±2139
BRS _{seq} (ms/Hgmm)	20,3±14,7	21,7±12,7
BRS _{spectral} (ms/Hgmm)	13,1±9,2	10,6±4,5

SDNN – a normál RR-intervallumok standard deviációja; RMSSD – a szomszédos RR-intervallumok különbségének a négyzetösszegének átlaga majd ennek a négyzetgyöke; pNN50 – azon RR-intervallumoknak a százalékos aránya, amelyek az előzőtől legalább 50 ms-mal különböznek; LF – a HRV alacsony frekvenciájú (0,05–0,15 Hz) teljesítménysűrűsége; HF – a HRV magas frekvenciájú (0,15–0,4 Hz) teljesítménysűrűsége; BRS_{seq} – szekvenciális spontán módszerrel meghatározott baroreflex-érzékenység; BRS_{spectral} – spektrális spontán módszerrel meghatározott baroreflex-érzékenység.

Az adatok átlag ± SD formátumban vannak feltüntetve. Nem találtunk szignifikáns különbséget p < 0,05 a két csoport között páratlan t-próbával, vagy nem normál eloszlás esetén Mann–Whitney-tesztel.

BRS_{phe}-értéke a kontrollcsoport adatainak 95%-os konfidenciaintervallumán kívül esik, azt meghaladja. A betegcsoportban a BRS- és HRV-indexek nem mutattak összefüggést sem a korrall, sem az operációtól eltelt idővel, sem a systolés vérnyomással. Nem találtunk nemi különbségeket az arteria carotis rugalmassági paraméterei és a BRS mutatói tekintetében, sem a beteg-, sem a kontrollcsoportban.



1. ábra

A BRS_{phe} és az arteria carotis disztensibilitása közti összefüggés TGA és kontrollalanyokban. A farmakológiai módszerrel meghatározott baroreflex-érzékenység (BRS_{phe}) és az a. carotis disztensibilitás között szoros összefüggés van a kontrollcsoportban (kör, r²=0,53, p <0,05), ez az összefüggés TGA-betegek esetében nem áll fenn (háromszög).

Diszkusszió

Megvizsgáltuk Senning-műtött TGA-betegekben a carotis elasztikus paramétereit, valamint a HRV- és BRS-indexeket, és ezen adatokat életkor és nem szerint egyeztetett kontrollok eredményeivel hasonlítottuk össze. Megnéztük továbbá ezen mutatók között fennálló összefüggést.

Feltételezésünk szerint a TGA-betegekben a károsodott aorticopulmonalis szeptáció mellett a nagyerek elasztikus funkciója is károsodott. Hipotézisünk alapjául fejlődésbiológiai eredmények szolgáltak. Avian-modell szerint a szív fejlődésében dúcléc eredetű, neurális sejtek kulcsszerepet játszanak (1, 2). Amikor ezen sejteket sebészileg roncsolták, az aorticopulmonalis szeptáció nem jött létre. A dúcléc eredetű sejtek hozzájárulnak a későbbi elasztikus érszakaszok, így az aorta és arteria pulmonalis érfali szerkezetének kialakításához, ezért a sebészi abláció a nagyartériák elasztikus mátrixának rendellenességéhez vezetett (13). Eredményeink szerint TGA-betegekben az abnormis aorticopulmonalis szeptáció az arteria carotis károsodott elaszticitásával párosul, ami alátámasztja feltételezésünket, mely szerint a szeptáció és az elasztogenezis humán embrióban is összefüggő folyamatok.

Eredményeink szerint az arteria carotis végdiastolés átmérője kisebb volt a betegcsoportban a kontrollokhoz képest, illetve az IMT szignifikánsan nagyobb volt TGA-ban. Ez arra enged következtetni, hogy nemcsak az elasztin, de az érfal egyéb összetevőinek kialakulása is zavart szenvedett. Ezt támasztják alá azok az embrionális eredmények, melyek szerint az intersticiális 3-as típusú és az intima 1-es típusú kollagének képződése is zavart szenvedett (1). Érdekes módon az érfal vastagsága nem függött össze az érfal rugalmasságával, ezért feltételezzük, hogy a strukturális és funkcionális elváltozások különböző szövettani eltérésekből adódnak. Munkánk részeként azonban szövettani vizsgálat nem történt.

Az emelkedett systolés és a csökkent diastolés nyomás jelezheti az artériás rendszer rugalmasságának korai csökkenését. A megemelkedett pulzusamplitúdó azonban oka és következménye is lehet az elasztikus nagyerek rugalmasságcsökkenésének. Jelen keresztmetszeti tanulmányunkban az okozati összefüggés feltárása nem lehetséges.

Többszörösen bizonyított, hogy az elasztikus erek merevebbé válása (arterial stiffness) független cardiovascularis rizikótényező (14). Ugyan TGA-betegekben ezen körülmény következményei nem tisztáztak eléggé, és további tanulmányt igényelnek, valószínűleg különös figyelemre van szükség klinikai utánkövetésükben. A cardiovascularis primer és szekunder prevenciónak – mint a rendszeres fizikai aktivitás vagy sószegény diéta – lényeges szerephez kell jutnia a betegek terápiájában (15, 16). Habár a TGA-betegek erős fizikai igénybevétele nem ajánlott, a rendszeres, mérsékelt sportolás azonban kívánatos lenne számukra. Emellett egyéb diétás megfontolások, mint a természetes, hal eredetű omega-3 zsírsav fogyasztása (17), illetve az aktív és passzív dohányzástól való tartózkodás (18) szintén fontosak lehetnek.

Munkánk másik részében a HRV- és BRS-indexeket, illetve ezek kapcsolatát a carotis rugalmassággal vizsgáltuk meg. Azt találtuk, hogy a csökkent carotisrugalmasság nem járt együtt károsodott baroreflex-érzékenységgel, valamint a szívfrekvencia-variabilitási indexek sem voltak szignifikánsan különbözőek a beteg és kontrollcsoportban.

A csökkent BRS és HRV a cardiovascularis morbiditás és mortalitás független rizikótényezője (19, 20). Néhány tanulmány vizsgálta ezeket az indexeket congenitalis szívfejlődési rendellenességekben (21-24). A különféle szívfejlődési rendellenességekben az eredmények sok esetben azt mutatják, hogy mind a műtét előtt, mind a műtét után csökkentek a HRV- és BRS-mutatók. A pitvari- (ASD) vagy kamrai (VSD) septumdefektussal rendelkező betegeknél, valamint jobb kamra kiáramlási rekonstrukciót követően csökkent HRV- és BRS-indexeket találtak. A csökkenés az ASD, VSD esetében kisebb volt, mint a jobb kamra kiáramlási rekonstrukciót követően (24). Fontan-műtéten átesett betegekben, illetve Fallot-tetralógia rekonstrukciója után a szív autonóm szabályozása számottevően romlott, amit a csökkent HRV- és BRS-paraméterek mutattak (21, 22). A csökkenés összefüggött a megelőző sebészeti beavatkozás jellegével, idejével, illetve a bal és jobb szívfél hemodinamikájával. A Fallot-tetralógiás betegeket érintő másik tanulmányban azonban csak a betegek 43%-a rendelkezett alacsonyabb HRV-értékekkel (23). A BRS- és HRV-indexekben bekövetkezett csökkenés nagyobb volt a műtét után közvetlenül, és részben helyreállt a későbbiekben. A HRV- és BRS-csökkenés annál nagyobb volt, minél több műtéti beavatkozás történt, és a műtétet követően fokozatosan állt helyre.

Vizsgálatunk eredményei alapján a TGA-beteg- és kontrollcsoportban nem volt szignifikáns különbség az autonóm indexekben. Ez azért váratlan eredmény, mert az autonóm idegek közvetlen károsodása a sebészeti beavatkozás során elkerülhetetlen. A centrális szimpatikus és paraszimpatikus idegek a vena cava superior, jobb pitvar, aorta ascendens és az arteria pulmonalis posteromedialis felszínén plexust képeznek – cardiopulmonalis afferensekkel együtt – (25), így a pericardium eltávolítása a jobb pitvar és a vena cava superior felszínéről a TGA-betegek korrekciós műtete alatt az autonóm idegek mechanikai károsodását idézi elő. Ezenkívül a károsodás bekövetkezhetett az idegek, illetve a sinuscsomó ischaemiájakor. Két tanulmányban összehasonlították szívfejlődési rendellenességekben a korrekciós műtét előtti és utáni autonóm indexeket, és azt találták, hogy a posztoperatív értékek jelentős mértékben csökkentek a preoperatívhoz képest (24, 26). Jelen eredményeink arra engednek következtetni, hogy a cardialis autonóm idegrendszeri funkció teljes mértékben helyreállt, illetve reinnerváció következhetett be. Ezt a hipotézist alátámasztja, hogy a nagyér-tanspozíció rekon-

struktív, arterial switch-műtete esetén a cardialis autonóm idegek részleges regenerációját találták (27). Szívtranszplantált betegekben is megfigyeltek paraszimpatikus és szimpatikus reinnervációt, és felvetik a sebészeti technikától való függetlenséget (28). Úgy tűnik, az autonóm idegrendszeri működés helyreállításának mértékében két faktor játszik szerepet. Egyrészt lényeges a műtét óta eltelt idő. *Ouchi és munkatársai* úgy találták, hogy az autonóm indexek a korrekciós műtét óta eltelt idővel párhuzamosan javultak. A BRS szignifikánsan korrelált a műtét utáni követési idővel a jobb kamra kiáramlási rekonstrukció esetében (24). Azonban a mi esetünkben nem ez a legvalószínűbb magyarázat, hiszen a HRV- és BRS-indexekben Fallot-tetralógiát helyreállító műtét után 26 évvel is károsodást mutattak ki (21). Jelen munkánkban pedig a műtét óta eltelt idő 12 ± 3 év volt, és nem találtunk összefüggést a BRS- és HRV-indexek, illetve az operációtól eltelt idő közt.

Másrészt fontos a sebészeti beavatkozás összetettsége. A HRV- és BRS-indexek fordított arányosságot mutattak a sebészeti beavatkozások számával a kongenitális szívfejlődési rendellenességek komplex formáiban (24). A pitvari switch-műtét a jobb pitvarra korlátozódik, ezáltal nem érinti sem a kamrát, sem a jobb kamra kiáramlási traktust vagy a pulmonalis artériát. Valószínű, hogy minél nagyobb a szív szövetek sebészeti károsodása és a cardiopulmonalis baroreceptorok régióinak sérülése, annál hosszabb távon áll fenn a baroreflex-funkció károsodása.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy egészségekben a carotis disztenziibilitása összefügg a baroreflex-érzékenységgel (6). Ezt a pozitív összefüggést az elasztikus tulajdonságok és a BRS között terhesekben és magasvérnyomás-betegségben is kimutatták (29, 30). Az életkorral összefüggésben lévő változások a BRS-ben korrelációt mutattak a centrális artériák rugalmasságával. Ülő életmódot folytató alanyok esetében a rendszeres fizikai aktivitás után a BRS és a carotis compliance javult, ami szoros és pozitív korrelációt mutatott (31). A BRS variabilitását 50%-ban a carotis disztenziibilitásában lévő különbségekkel magyarázták.

Vitatható, hogy az aránylag alacsony betegszám miatt nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport között a BRS_{phe} esetében. Azonban a BRS és a carotis disztenziibilitás közötti összefüggés teljes hiánya arra enged következtetni, hogy a beteg- és kontrollcsoportban más mechanizmusok határozzák meg a baroreflex-érzékenységet. A baroszoros erek alakítják át az artériás vérnyomás ingadozását érfal feszüléssé, ami a baroreceptorok adekvát ingere, így az erek kulcsfontosságúak a baroreflex működésében. Eredményeink azonban a BRS neurális komponensének fontosságát hangsúlyozzák. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a carotis disztenziibilitása kora gyerekkortól csökken, azonban a BRS a pubertáskorig nő (32). Tehát ebben a periódusban a neurális mechanizmusok határozzák meg a BRS alakulását és nem a carotis elaszticitása. Egy másik tanulmány szerint mind vascularis, mind neurális mechanizmusok szerepet játszanak az életkorral összefüggő BRS csökkenésben, míg a rövid távú fizikai aktivitás valószínűleg a neurális vagus kontroll erősítésével mérsékli a csökkenést (33). Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a központi idegrendszer plaszticitása fontos szerepet játszik a cardiopulmonalis autonóm szabályozásban. A neurális plaszticitás eredményeinkre is magyarázatot adhat. Feltételezzük, hogy a merevebb érfalból származó csökkent baroreceptor-inputot kompenzálja a központi struktúrák alkalmazkodása, ami a baroreflex építési funkcióját eredményezi. A neurális komponensek alkalmazkodóképességét támasztja alá a resetting jelensége is (34).

Irodalom

1. Rosenquist TH, Modis L. Spatial disorder of collagens in the great vessels, associated with congenital heart defects. *The Anatomical record*. 1991; 229:116-124.
2. Hutson MR, Kirby ML. Neural crest and cardiovascular development: A 20-year perspective. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 2003; 69:2-13.
3. Niwa K, Perloff JK, Bhuta SM, Laks H, Drinkwater DC, Child JS, et al. Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: Light and electron microscopic analyses. *Circulation*. 2001; 103:393-400.
4. Roubertie F, Thambo JB, Bretonneau A, Iriart X, Laborde N, Baudet E, et al. Late outcome of 132 senning procedures after 20 years of follow-up. *The Annals of thoracic surgery*. 2011; 92:2206-2213; discussion 2213-2204.
5. Ohuchi H, Negishi J, Miyake A, Sakaguchi H, Miyazaki A, Yamada O. Long-term prognostic value of cardiac autonomic nervous activity in postoperative patients with congenital heart disease. *International journal of cardiology*. 2011; 151:296-302.
6. Bonyhay I, Jokkel G, Kollai M. Relation between baroreflex sensitivity and carotid artery elasticity in healthy humans. *The American journal of physiology*. 1996; 271:H1139-1144.
7. Hoeks AP, Brands PJ, Smeets FA, Reneman RS. Assessment of the distensibility of superficial arteries. *Ultrasound in medicine & biology*. 1990; 16:121-128.
8. Kelly R, Fitchett D. Noninvasive determination of aortic input impedance and external left ventricular power output: A validation and repeatability study of a new technique. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992; 20:952-963.
9. Monos E. Hemodynamics – biomechanics of the circulation. Budapest: Semmelweis Publishers; 2011.
10. Parati G, Di Rienzo M, Mancia G. How to measure baroreflex sensitivity: From the cardiovascular laboratory to daily life. *Journal of hypertension*. 2000; 18:7-19.
11. Smyth HS, Sleight P, Pickering GW. Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man. A quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. *Circulation research*. 1969; 24:109-121.
12. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996; 93:1043-1065.
13. Rosenquist TH, Beall AC, Modis L, Fishman R. Impaired elastic matrix development in the great arteries after ablation of the cardiac neural crest. *The Anatomical record*. 1990; 226:347-359.
14. Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and cardiovascular risk. *Current opinion in cardiology*. 2000; 15:258-263.
15. Gates PE, Tanaka H, Hiatt WR, Seals DR. Dietary sodium restriction rapidly improves large elastic artery compliance in older adults with systolic hypertension. *Hypertension*. 2004; 44:35-41.
16. Tanaka H, Dinverno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation*. 2000; 102:1270-1275.
17. Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P, et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997; 17:3392-3398.
18. Mack WJ, Islam T, Lee Z, Selzer RH, Hodis HN. Environmental tobacco smoke and carotid arterial stiffness. *Preventive medicine*. 2003; 37:148-154.
19. Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Jr., Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 1987; 59:256-262.
20. Mortara A, La Rovere MT, Pinna GD, Prpa A, Maestri R, Febo O, et al. Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure: Clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. *Circulation*. 1997; 96:3450-3458.
21. Davos CH, Davlouros PA, Wensel R, Francis D, Davies LC, Kilner PJ, et al. Global impairment of cardiac autonomic nervous activity late after repair of tetralogy of fallot. *Circulation*. 2002; 106:169-75.
22. Davos CH, Francis DP, Leenarts MF, Yap SC, Li W, Davlouros PA, et al. Global impairment of cardiac autonomic nervous activity late after the fontan operation. *Circulation*. 2003; 108 Suppl 1:III180-185.
23. McLeod KA, Hillis WS, Houston AB, Wilson N, Trainer A, Neilson J, et al. Reduced heart rate variability following repair of tetralogy of fallot. *Heart*. 1999; 81:656-660.
24. Ohuchi H, Suzuki H, Toyohara K, Tatsumi K, Ono Y, Arakaki Y, et al. Abnormal cardiac autonomic nervous activity after right ventricular outflow tract reconstruction. *Circulation*. 2000; 102:2732-2738.
25. Janes RD, Brandys JC, Hopkins DA, Johnstone DE, Murphy DA, Armour JA. Anatomy of human extrinsic cardiac nerves and ganglia. *The American journal of cardiology*. 1986; 57:299-309.
26. Rydberg A, Wiklund U, Rask P, Hornsten R. Serial assessment of variability in heart rate in children with the fontan circulation. *Cardiology in the young*. 2005; 15:498-503.
27. Sakurai H, Maeda M, Miyahara K, Nakayama M, Murayama H, Hasegawa H, et al. [evaluation of cardiac autonomic nerves by iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy and ambulatory electrocardiography in patients after arterial switch operations]. *Journal of cardiology*. 2000; 35:353-362.
28. Bernardi L, Valentini C, Wdowczyk-Szulc J, Frey AW, Rinaldi M, Spadacini G, et al. Influence of type of surgery on the occurrence of parasympathetic reinnervation after cardiac transplantation. *Circulation*. 1998; 97:1368-1374.
29. Lage SG, Polak JF, O'Leary DH, Creager MA. Relationship of arterial compliance to baroreflex function in hypertensive patients. *The American journal of physiology*. 1993; 265:H232-237.
30. Visontai Z, Lenard Z, Studinger P, Rigo J, Jr., Kollai M. Impaired baroreflex function during pregnancy is associated with stiffening of the carotid artery. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2002; 20:364-369.
31. Monahan KD, Tanaka H, Dinverno FA, Seals DR. Central arterial compliance is associated with age- and habitual exercise-related differences in cardiovagal baroreflex sensitivity. *Circulation*. 2001; 104:1627-1632.
32. Lenard Z, Studinger P, Mersich B, Kocsis L, Kollai M. Maturation of cardiovagal autonomic function from childhood to young adult age. *Circulation*. 2004; 110:2307-2312.
33. Deley G, Picard G, Taylor JA. Arterial baroreflex control of cardiac vagal outflow in older individuals can be enhanced by aerobic exercise training. *Hypertension*. 2009; 53:826-832.
34. Michelini LC, Stern JE. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: Role in cardiovascular control. *Experimental physiology*. 2009; 94:947-960.

A reninszekréció vizsgálata multifoton-mikroszkóppal a vese akut és krónikus kórfolyamataiban

Experimental studies on renin secretion in acute and chronic renal diseases using multiphoton microscopy

Prókai Ágnes¹
Himer Leonóra¹
Berta Nóra¹
Kosik Anna¹
Vannay Ádám¹
Kis-Petik Katalin²
Szabó J Attila¹

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés:* A tacrolimus (Tac) és a cyclosporin A (CyA) két nagy potenciálú immunosuppresszáns, amelyek ma még elengedhetetlen terápiás megoldásai az allograft rejekciónak kivédésének és a hosszú távú immunosuppresszióknak, ám ismert és hangsúlyosan figyelmet érdemlő tulajdonságuk nefrotoxikus voltak is. *Célok és módszerek:* Háromhetes, hím C57 black 6 egerek (n=15) három csoportján végeztük a vizsgálatokat: kontroll (K), 2-szer 0,075 mg/kg/nap Tac-kezelt (Tac) és 2 mg/kg/nap CyA-kezelt (CyA) állatokon. Háromhetes kezelést követően vizsgáltuk a laboratóriumi paramétereiket (szérumkreatinin), majd FACS analízissel, illetve multifoton-mikroszkópiával a gyűjtőcsatorna, illetve JGA renintartalmát. Nyilatkoztunk az erek konstriktójáról és a következményes fibrózist Masson-festéssel ítéltük meg. *Eredmények:* A szérumkreatinin szignifikánsan megemelkedett a Tac és a CyA csoportokban. Mind a JGA, mind a gyűjtőcsatorna renintartalma négyeszeresére nőtt a calcineurin inhibitor kezelés hatására, amelyet sikerült multifoton-mikroszkópiával is alátámasztani, a renin-granulátság mindkét lokalizációban jelentősen megnőtt. E lokális aktiváció következményeként vazokonstriktót tapasztaltunk mindkét kezelt csoportban, és már az immunosuppresszió korai szakaszában, a harmadik héten fibrotikus szigeteket mutattunk ki a vesében. *Következtetések:* Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a calcineurin-inhibitorok károsító hatással bírnak a veseparenchymára, ami tanulmányunk alapján összefüggésbe hozható egy megnövekedett reninaktivációval nemcsak a JGA-ban, de a gyűjtőcsatornában is – utóbbi új leírás az irodalomban. Mindezek alapján a renin-angiotenzin rendszer gátlása több ponton is hatékony lehet a calcineurin-inhibitorok nefrotoxikus hatásának megelőzésére. További vizsgálatok szükségesek, hogy milyen gátlószerek és milyen kombinációban lehetnek a leghatékonyabbak a kezelésben.

KULCSSZAVAK immunosuppresszió, lokális RAS, multifoton-fluoreszcens mikroszkópia, gyűjtőcsatorna

SUMMARY *Introduction:* Tacrolimus (Tac) and Cyclosporin A (CyA) are two great potential immunosuppressants which are essential therapeutic solutions for the prevention of allograft rejection and long-term immunosuppression, however, it is well known and deserves special attention that both of them possess nephrotoxic potential. *Aim and methods:* Two week old, male C57 black 6 mice (n=15) were divided into three groups: control mice (C), treated with 0.075 mg/kg/day of Tac twice a day (Tac) or treated with 2 mg/kg/day of CyA (CyA). Three weeks after the administration serum creatinine was measured, then the renin content in the collecting duct (CD) and juxtaglomerular apparatus (JGA) was evaluated using FACS and multi-photon microscopy. The contraction of the vessels was assessed and the consequent fibrosis was determined by Masson staining. *Results:* Serum creatinine was significantly elevated in both the Tac and the CyA groups. In the two investigated localizations (JGA and CD), renin content increased to a four time higher level following the administration of calcineurin inhibitors, which was further supported by multi-photon microscopy showing that the renin granulation increased remarkably in both localizations. As a result of the local activation, vasoconstriction was present in both treated groups. Furthermore, as early as the third week after treatment with immunosuppressants, fibrotic islands were found in the kidney. *Conclusions:* Our studies revealed that calcineurin inhibitors exert nephrotoxic effect on the kidney parenchyma, which could be the consequence of the enhanced renin activity not only in JGA but in the collecting duct segment as well. Therefore, the inhibition of renin-angiotensin system could be beneficial in prevention the nephrotoxic effect of the calcineurin inhibitors. However, further studies are needed to reveal what kind of inhibitors and in which combination could provide the most efficient treatment.

KEY WORDS immunosuppression, local RAS, multi-photon microscopy, collecting duct

¹Semmelweis Egyetem,
I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika,
²Semmelweis Egyetem,
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Prókai Ágnes
Semmelweis Egyetem,
I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika
1083 Budapest,
Bókay János u. 53-54.

E-mail:

prokaiaignes@yahoo.com

Bevezetés

A renin, mint a renin–angiotenzin–aldoszteron rendszer (RAAS) sebesség meghatározója, fontos szerepet játszik szervezetünk só- és vízháztartásának, valamint vérnyomásának szabályozásában. Ezen túl a renin a lokális RAAS részeként releváns lehet a gyulladásban, trofikus és profibrotikus hatásokban is. A sejtek, melyek termelik, tárolják és felszabadítják a renint, jelenleg még nem teljesen körülfártak.

A vesetranszplantáció jelenleg a végállapotú veseelégtelenség egyetlen definitív terápiás megoldása. Az allograftvesztés okai sokat változtak a modern immunszuppresszív szerek bevezetése óta; az egyéves veseallograft-túlélés jelentősen javult a jobb regimek következtében, ellenben, a krónikus allograft-nephropathia (CAN) még mindig a vesegriftvesztés legfőbb okaként szerepel (1). A CAN karakterizálható a vese interstitiuma, a glomerulusok és az erek progresszív sclerosisával, ami végső soron fibrigenezishez és graftvesztéshez vezet (2). Habár a CAN következtében kialakuló rejkciót tradicionálisan a kismértékű allogénikus szövetre adott válaszok ismétlődése jellemzi, számos bizonyíték azt jelzi, hogy alloantigén független faktorok szintén hozzájárulhatnak a patogeneziséhez (3). Ezek magukba foglalnak számos determinánst, melyek között a calcineurin-inhibitorok (CNI) nefrotoxikus hatása jelentős és egyben módosítható faktor.

A CAN kifejlődésében a CNI-nefrotoxicitás jelentős szerepet játszik, ennek ellenére a háttérben meghúzódó patomechanizmus még mindig nem teljes mértékben feltárt. Az akutan kialakuló nephropathia – úgy tűnik – a veséáramlás csökkenésének következményeként alakul ki, ami az afferens arteriola vazokonstriktójából fakad. Másrészt, az intrarenalis RAAS aktivációja megnöveli az endothelin-1 felszabadulását, és az NO és az NO-szintáz diszregulációját eredményezi. Továbbá a transzformáló növekedési faktor béta-1 növekedése, a nagyobb számban előforduló apoptózis, a gyulladásos mediátorok stimulációja, a megnövekedett innate immunitás és az endoplazmatikus retikulum stresszállapotának szerepét feltételezik a krónikus CNI-nephropathia patogenezisében (4). Következésképpen fejlődik ki a tubularis károsodás, interstitialis fibrózis és arteriopathia jellemző hisztológiai képe, amit a vese funkciójának csökkenése kísér.

A renin szerepe a CNI-nephropathia inicializálásában, későbbi fenntartásában ezidáig nem állt a vizsgálatok középpontjában. Bár ismert, hogy CNI-vel kezelt patkányok juxtaglomerularis apparatus (JGA)-ában hypertrophia jön létre (5). Kimutatták továbbá, hogy a JGA sejtek kifejezik a calcineurin-izofomákat, amelyek cyclosporin A (CyA)-val történő gátlása szignifikánsan stimulálja tenyésztett granuláris sejtekből a renin felszabadulását (6). In vivo ez további megerősítést nyert, az afferens arteriolákban levő renin recruitment-jét tapasztalták CyA-kezelt patkányok veséjében, ami jelentős hemodinamikai változást okozott a vese mikrovaszkulaturájában (7). Hasonló megfigyeléseket írtak le tacrolimus (Tac)-hoz kapcsolódva is, adminisztrációja nagyban megemelte a plazma renin-aktivitást (8). Fontos azonban megjegyezni, hogy minden tanulmány csupán a JGA reninre fókuszált, és a helyi RAAS más lokalizációit nem vette figyelembe. Függetlenül a renin eredetétől, a triggerelt termelés és szekréció végső következménye a transzformáló növekedési faktor-béta (TGFβ1) és a bazális fibroblastnövekedési faktor (9) által inicializált mátrix fehérjék akkumulációja.

Végül, de nem utolsón, bizonyítékok egész sora demonstrálta, hogy jelentős nemi különbség jellemző a RAAS regulációjában; androgének pozitívan modulálják ezt a rend-

szert; rövid távon a direkt vazokonstriktós hatásuknál fogva, valamint az extracelluláris folyadékterefogat vesekontrolljának megváltoztatása által, míg hosszú távon az apoptózis, gyulladás és fibrózis azok a faktorok, amelyek az androgének által súlyosbítják a postschaemiás periódust (10). Nőstényekben az ösztrogén kompenzálja ezen hatásokat, habár nem a RAAS gátlása, hanem a potens vazodilatáns NO által (10). A CNI nefrotoxicitás esetén, a reninszabályozás nemek közötti különbségét ezidáig nem vizsgálták.

Célkitűzésünk volt megválaszolni annak a kérdésnek a vizsgálatát, hogy vajon a CNI, legalább részben, a lokális RAAS inicializálásán keresztül fejti-e ki nefrotoxikus hatását, különös tekintettel az összekötő szegmensben vagy a gyűjtőcsatornában.

Módszerek

A CNI nephropathia in vivo modellje

Minden erőfeszítést megtettünk, hogy az állatok diszkomfortját és fájdalmát minimalizáljuk. Az egereket standard körülmények között tartottuk hőmérséklet-kontrollált (22 ± 1 °C) szobákban, ahol a világos és sötét periódusok alternáltak. Az akut kísérletek általános anesztéziában történtek. Minden protokollt a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezett.

A kísérletek első szériájában kéthetes, hím C57 black 6 egereket (n=15) három csoportba osztottuk: kontroll egerek, kétszer egy nap 0,075 mg/kg/nap Tac-kezelt egerek és 2 mg/kg/nap CyA-kezelt egerek. Az kezelés három hetét követően az állatokat képkalkotókkal vizsgáltuk vagy harvesteltük további feldolgozás céljából.

Vesefunkciós paraméterek

A szérumból és vizeletből vesefunkciós paramétereket (véreureanitrogén, kreatinin, nátrium, kálium, albumin) a kereskedelmi forgalomban kapható kiték segítségével határozzuk meg.

Hisztológiai vizsgálat

A paraffinos vesemetszeteket hematoxilinnel/eozinnal, perjód-sav-Schiff- és Masson-reagenssel festettük meg. A mintákat kódoltuk és fénymikroszkóppal 0-tól 4-ig terjedő skálán a tubularis károsodást, tubulointerstitialis fibrózis mértékét és az interstitialis beszűrődést szemikvantitatív módon ítéltük meg.

Multifoton-excitációs mikroszkópia

A multifoton-excitációs mikroszkópia state-of-the-art konfokális képkalkotó módszer, amely ideális a szövet mély optikai szelvényezéséhez (11). Képes ultraérzékeny, mennyiségi képkalkotás kivitelezésére, valamint a szervek funkciójának feltérképezésére egészségesben és betegben olyan időbeli és térbeli felbontással, amelyre más képkalkotó eszközök nem nyújtanak lehetőséget. A sejtbeli változók, mint például a citoszolikus kalcium, pH, sejt-sejt kommunikáció és szignálpropagáció, a JGA-ban történő interstitialis folyadékáramlás,

a tubuloglomerularis feedback valósidejű képkalkotása, továbbá a glomerularis filtráció, permeabilitás, koncentráció, hígítás jól vizualizálható. Mi több, ennek a minimálisan invazív eszköznek a felhasználásával lehetőség van a vesefunkciók mennyiségi meghatározására is *in vivo*, magába foglalva az intrarenalis RAAS aktivitását, a renin felszabadulásának mechanizmusát és a vazoreguláció kontrollját.

Az állatok ketamine és xylazine oldatát kapták intraperitonealisan (800 µl/kg és 200 µl/kg), majd homotermikus műteti asztalra helyezésüket követően hőmérsékletüket ~37 °C körül tartottuk egy elektromos melegítő padon. Megfelelő anesztéziát követően az állatok bőrét Betadinnal fertőtlenítettük, majd leborotváltuk a nyak területét és a bal dorsalis oldalt. Ezt követően mm-es bemetszés történt a nyaki régióban, hogy elérhetővé váljék a trachea és a carotis. Miután a stabil légzés biztosítására óvatosan feltártuk a tracheát, a carotist kanüláltuk a festék bejutása céljából. Ezt követően a bal oldali metszésen a bal vesét finoman kiemeltük, és a mikroszkóp munkafelületére helyeztük. A vesét folyamatosan 0,9%-os sóoldatban áztattuk a képkalkotás során (1. ábra).

Fluoreszcens képeket készítettünk a Femto 2D magas szenzitivitású galvanoscanner-alapú multifoton-mikroszkóp rendszerrel (FemtonicsInc, Budapest) kiegészített Olympus Invert mikroszkóppal. A képek Olympus 60× glicerín immerziós objektíven keresztül készültek (numerikus aperture: 1,3). Fluoreszcens excitációt a mode locked titanium-sapphire lézer (Spectra-PhysicsInc., Irvine, CA) biztosított. A fotonokat külön fotonokszorozók gyűjtötték be maximális pinhole-lal, 12 bit-es intenzitás skálával és 100 µm-es maximális mélységgel. A képek és adatok véglegesítése Matlab és Image J software-rel történt.

A fluoreszcens festéket a carotison keresztül bolus salsol kíséretében fecskendeztük be. 70 kDa rodamin dextranszolgálat a vaszkulátúra és quinacrin a savas granulomok, így a renin tartalmú granulomok megfestésére. A Hoechst a magokat emelte ki.

FACS analízis

A három hét elteltét követően az állatok harvestelése történt, veséiket kivettük és permeabilizáltuk FACSTM Permeabilizing Solution 2 (10×) (Perm2)-vel 10 percig, szobahőn (RT). A permeabilizálást követően a sejteket PBS-sel mostuk és renin és AQP2 antitestekkel inkubáltuk. Ezt követően a sejteket Perm2-vel mostuk és a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk fél óráig, RT-n sötétben. A

negatív kontrollokat csupán másodlagos antitesttel inkubáltuk. Mindezt követően a sejteket Perm2-vel mostuk át, centrifugáltuk (800 g/RT/perc), majd ismét PBS-be helyeztük. A citometriás analízis FACSria citometerrel történt. A forward és a side mintának megfelelően azonosítottuk az ép sejtpopulációt. Tízezer sejtet gyűjtöttünk össze, és a belőlük származó adatokat elemeztük.

Statisztikai analízis

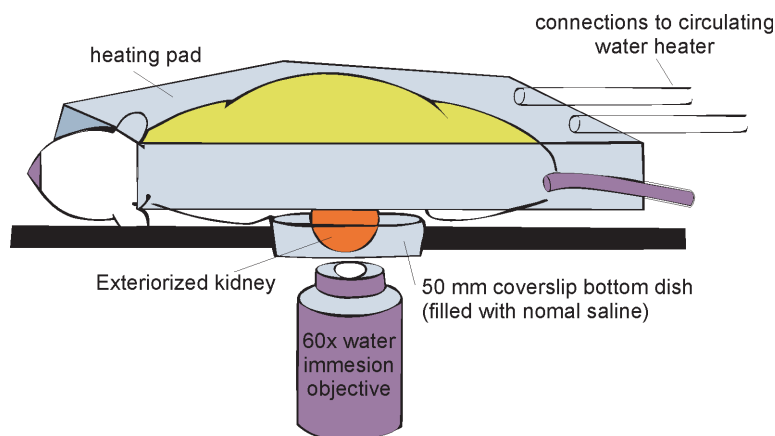
Az adatokat STATISTICA. 6 software-rel analizáltuk. Az adatokat átlag ±SEM szerint ábrázoltuk. A normális eloszlást Kolmogorov–Smirnov-tesztel ellenőrizzük. Az összehasonlításokat ANOVA és Fisher-féle post-hoc teszttel végeztük. A hisztológiai kiértékeléseket Kruskal–Wallis-tesztel végeztük, amit többszörös pár-illesztett összehasonlítás követett a Dunn-teszttel megfelelően. A p értéket akkor fogadtuk el szignifikánsnak, ha értéke <0,05.

Eredmények

A savas granulomokat megfestő quinacrin kirajzolta a renin jelenlétét egyrészt a JGA-ban (2A ábra), másrészt a gyűjtőcsatorna basolateralis oldalán és némely sejt (feltételezhetően principális sejt) citoszóljában granuláris szerkezetet mutatva és ezen sejtek apikális felszínén is (2B ábra). Összességében a renin klasszikus szekréciós helyén, a JGA-n túl, jelentős mennyiségben termelődött és szekretálódott ez a hormon az összekötő és gyűjtőcsatornában is.

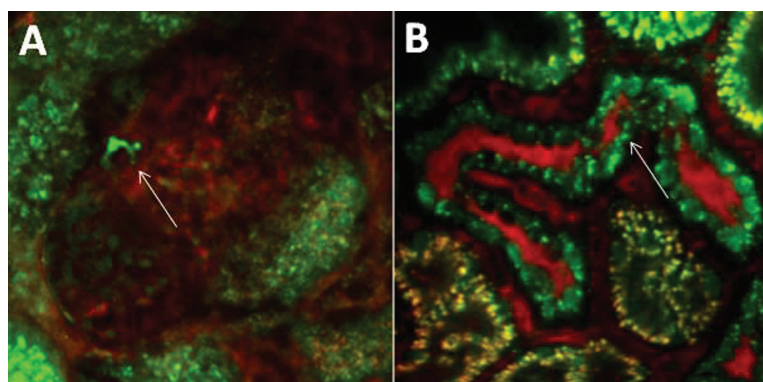
A multifoton-technika beállítását és a renin vizualizálás lehetőségének bizonyítását követően kísérleti felállásunknak megfelelően három csoportban vizsgáltuk a renin mennyiségét, termelődését és szekrécióját (3. ábra). Kontroll egerek JGA-jában csupán néhány granuláris sejt volt található, melyek renin szekretáltak és gyűjtőcsatornájukban alig, ha egyáltalán látható volt a granuláció. Ezzel szemben a Tac-kezelt csoport megnövekedett számú granuláris sejtet mutatott, melyek visszadifferenciálódtak renintermelő sejtekké, és a gyűjtőcsatornában is fokozott granuláció volt megfigyelhető. A CyA-kezelt csoport hasonló képet mutatott, mindkét általunk vizsgált lokalizációban szignifikánsan megnőtt a renin jelenléte a kontroll egerekhez képest.

Áramlási citometriával elkülönítettük a fentebb vizsgált képleteket, AQP2-t használtunk a principális sejtek kiválogatásához, ezzel tudtuk elválasztani ezt a sejtpopulációt a vesé-



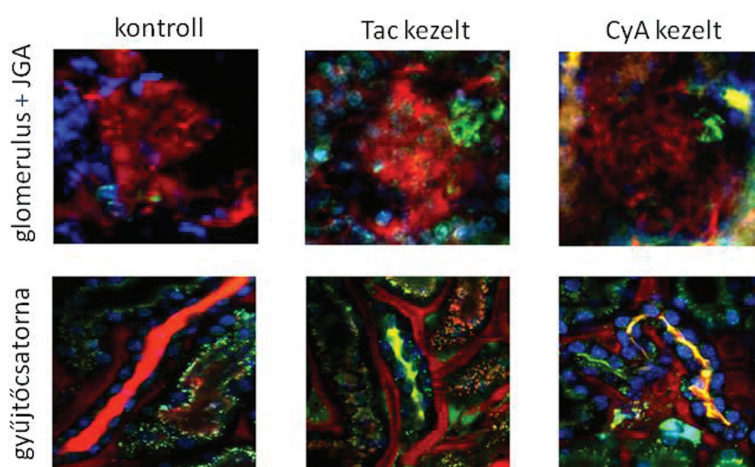
1. ábra

Az állat pozíciója multifoton-mikroszkópia során (köszönettel Peti-Peterdi Jánosnak)



2. ábra

Multifoton-mikroszkópiával való vizualizálása a renin termelésének és szekréciójának két ismert lokalizációja. A Panel: juxtaglomerularis apparatus (JGA) granularis sejtjei (nyíl), B Panel: gyűjtőcsatorna pricipális sejtjei.

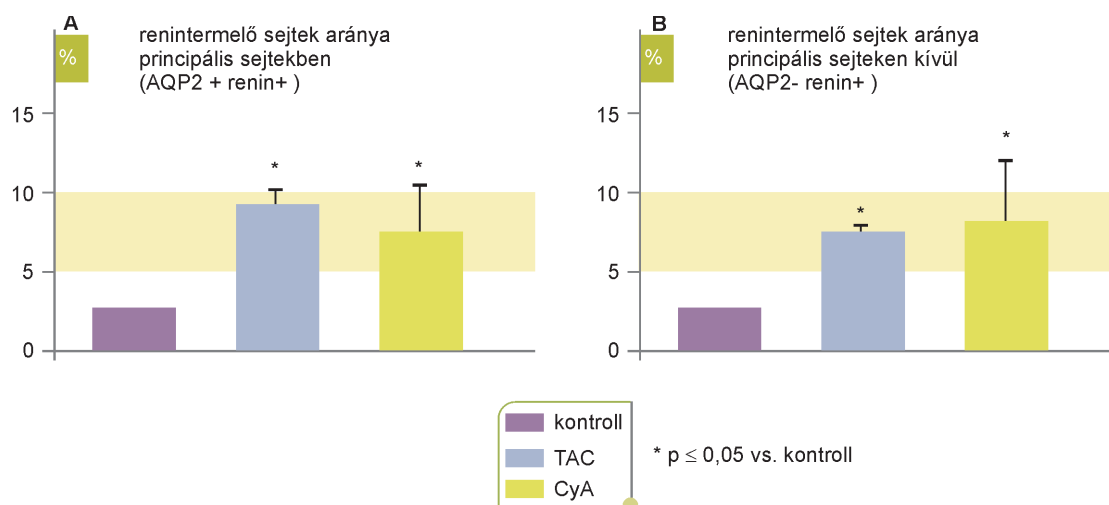


3. ábra

Multifoton-mikroszkópiával a három vizsgált csoportban megjelenő renin. Kontroll állatok JGA és gyűjtőcsatornájában granuláció alig figyelhető meg, ellenben a két calcineurin-inhibitor- (CNI) kezelt csoportban mind a JGA, mind a gyűjtőcsatorna szignifikánsan nagyobb mennyiségben termelődött és került szekrécióra.

ben található minden más sejttől. Ezt követően a két sejtpopuláción belül elkülönítettük a renintermelő sejteket. A 4A ábra mutatja, hogy míg kontroll állatok principális sejtjeinek csupán 2%-a termelt és szekretált renint, addig ez háromhetes

immunszuppresszáns kezelést követően már szignifikánsan, háromszorosára nőtt mindkét kezelt csoportban. A renintartalom hasonlóan alakult a JGA esetében is (4B ábra).

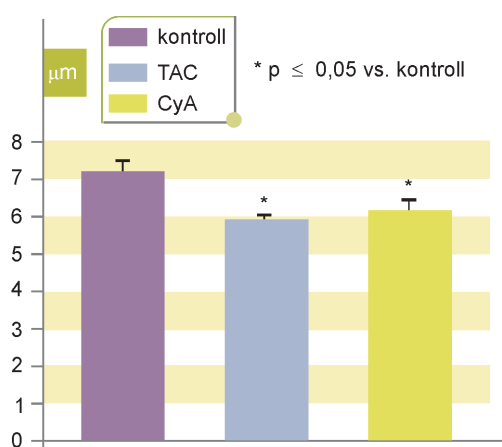


4. ábra

Áramlási citometriával különválasztottuk az AQP2-pozitív (principális sejtek) és -negatív sejteket, valamint azon belül is a renintermelő sejteket, illetve az azt nem tévőket. A kontrollcsoport élesen elkülönült a két CNI kezelttől, míg az előbbi esetén a sejtek csupán 2%-a termelt renint mindkét lokalizációban, addig a két immunszupprimált csoport ennek az ötszörös mennyiségében fejezte ki a renint.

A renin közvetlen hatásának egyikéként multifoton-technikákkal képesek voltunk vizsgálni az érátmérők változását. Az 5. ábra jól demonstrálja, hogy kontroll állatokban a megközelítőleg 7 µm-es átlagos érátmérő közel 2 µm-t csökkent, vagyis a megnövekedett reninszekréció ilyen fokú kontrakciót hozott létre mindkét vizsgált csoportban.

Ezen érkontrakció jelentős mértékű hypoxiát eredményezett, aminek a következménye lehet a makroszkopikusan köteges megjelenésű elköltözővetesedés inicializációja. A 6. ábra ezen változásokat mutatja, miszerint kontroll állatok veséjének Masson-festése nem mutatott fibrotikus elváltozást (6A ábra), míg a két kezelt csoportban fellelhetők voltak a köteges, erek mellett futó kollagénrostok kék színű festődése (6B és 6C ábra).



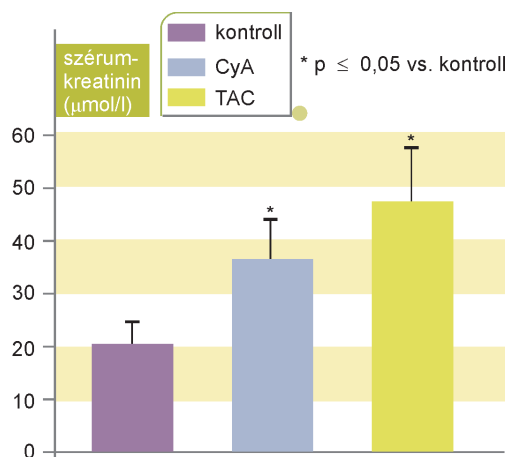
5. ábra

Multifoton-mikroszkópiával a három vizsgált csoport érátmérőit elemeztük. Kontroll állatok 7 µm-es átlagos átmérője közel 2 µm-t csökkent, vagyis a megnövekedett reninszekréció ilyen fokú kontrakciót hozott létre mindkét vizsgált csoportban.

Kísérleteink utolsó lépéseként a vese funkcionális változását vizsgáltuk. A kontroll állatok szérumkreatinin-szintjéhez képest mind a CyA-, mind a Tac-kezelt csoportban szignifikánsan megnőtt ezen vesefunkciós paraméter szintje (7. ábra).

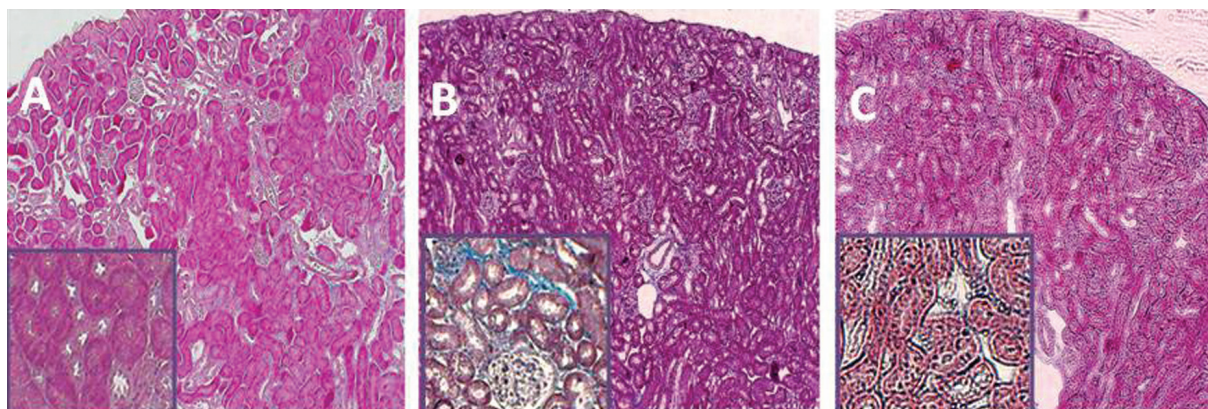
Megbeszélés

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a calcineurin-inhibitorok károsító hatással bírnak a veseparenchymára, ami – tanulmányunk alapján – összefüggésbe hozható a megnövekedett reninaktivációval nemcsak a JGA-ban, de a gyűjtőcsatornában is. Utóbbi új leírás az irodalomban. A fokozott



7. ábra

Vese funkcionális változását vizsgáltuk. A kontroll állatok szérumkreatinin-szintjéhez képest mind a két CNI-kezelt csoportban szignifikánsan megnőtt ezen vesefunkciós paraméter szintje.



6. ábra

Masson-festést elvégezve kontroll állatok veséje nem mutatott fibrotikus elváltozást (A), míg a két kezelt csoportban fellelhetők voltak a köteges, erek mellett futó kollagénrostok kék színben való festődése (B, C).

renintermelődés a nagyobb sejtpopulációt magába foglaló gyűjtőcsatorna lokalizációban vazokonstriktációt, következményes hypoxiát és ezáltal fibrogenezist indukált, mely hatások eredője a vese romló funkciója.

A CAN komplex folyamat számos kaszkádot, regulációs faktort foglal magába, ám pontos patomechanizmusa még mindig nem ismert. Vannak alloantigén-függő és -független faktorok, amelyek közül munkánk a CNI-nefrotoxicitást vette górcső alá. A legelemibb faktor, ami jelen volt modellünkben a hypoxia. Az oxigén részleges hiánya minden vesesejtben a citrátciklus zavarát eredményezi, következményesen a szukcinát akkumulálódik, és kilép a mitokondriumból a citoplazmába és az extracelluláris térbe (12). A szukcinát a GPR91 receptorán keresztül autokrin és parakrin módon fokozza számos mestergén transzkripcióját, köztük a RAAS sebességmeghatározó lépését is, a renintermelést. Az összekötő szegmensben és a gyűjtőcsatornában is igen nagy mennyiségben található GPR91-receptor (13), az általa triggerelt és itt termelődő renin, amelyet diabeteses modellben már leírtak (14-16), egyike lehet a legfontosabb jelátvivőknek, melyek a hypoxiát hivatottak jelezni. A renin az angiotenzin-II-n keresztül tovább súlyosbítja a vazokonstriktációt, majd egy későbbi lépésben profibrotikus útvonalat indít be, amelyek további fokozott működésre vannak serkentve a renin (P)RR-án történő aktivációját követően (17).

A renin CNI-nefrotoxicitásban betöltött központi szerepére utal az is, hogy RAAS-gátlást alkalmazva a CNI

nefrotoxicitás kivédéséről, de legalábbis javulásáról számoltak be. Például a RAAS gátlását követően az interstitialis fibrózis sokkal kevésbé volt kifejezett azokban a patkányokban, amelyek a fibrogenikus citokin-overexpresszió, mint például TGF- β , PDGF és IL6 miatt Tac nefrotoxicitást mutattak (18). Ez további bizonyítást nyert egy tanulmányban, amelyben 5/6 szubtotális nephrectomia modellben a RAAS gátlása az IL2-gátlással együtt sokkal hatékonyabb volt a progresszív glomerulosclerosis kifejlődésének kivédésében, mint a monoterápiás kezelés (19). Munkacsoportunk által is leírásra került, hogy ACE-gátlást követően a profibrotikus útvonalak számos tagjának mRNS szintje szignifikánsan csökken, míg az angiotenzinogén mRNS szintje kompenzatorikusan megnő (20). Látni kell viszont, hogy a direkt renin gátlást, mint a CNI nefrotoxicitás kivédésének terápiás eszközét illetően, az irodalom teljes mértékben hiányos.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy bevezettük és elindítottuk a multifoton-metodikát a magyar nefrológiai alap kutatásban. A juxtaglomerularis apparatus mellett a gyűjtőcsatornában is sikerült megjeleníteni a renin termelődését és szekrécióját. A calcineurin-inhibitor CyA és Tac fokozta a juxtaglomerularis és gyűjtőcsatorna renin-sekrecióját. Ezek mind akut, mind krónikus reninhatásokat kiváltva rontják a vese működését. Így a renin gátlása terápiás lehetőség lehet az immunosuppresszív szerek okozta nefrotoxicitás akut és krónikus következményeinek csökkentésében.

Irodalom

- Cecka JM, Terasaki PI. The UNOS scientific renal transplant registry. United Network for Organ Sharing. *ClinTranspl.* 1995;1-18.
- Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:212-222.
- Fellström BC, Larsson E. Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection (CVR). *Immunol Rev.* 1993; 134:83-98.
- Bennett WM. Insights into chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1996; 34:515-519.
- Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ. Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *ExpNephrol.* 1994; 2:324-333.
- Madsen K, Friis UG, Gooch JL, Hansen PB, Holmgaard L, Skøtt O, Jensen BL. Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 2010; 77:110-117.
- Norling LL, Tufro-McReddie A, Ariel Gomez R, Moore LC, Kaskel FJ. Accumulation of acidic renin isoforms in kidneys of cyclosporine-A-treated rats. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7:331-337.
- Andoh TF, Burdmann EA, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: experimental and clinical observations. *SeminNephrol.* 1997; 17:34-45.
- Rajnoch J, Lodererova A, Szabo A, Honsova E, Vannay A, Bloudickova S, Matl I, Viklicky O. Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats: effect of tacrolimus. *Transplant Proc.* 2005; 37:352-354.
- Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010; 24:687-698.
- Peti-Peterdi J, Burford JL, Hackl MJ. The first decade of using multiphoton microscopy for high-power kidney imaging. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012; 302:F227-233.
- Peti-Peterdi J. High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91. *Kidney Int.* 2010; 78:1214-1247.
- Robben JH, Fenton RA, Vargas SL, Schweer H, Peti-Peterdi J, Deen PM, Milligan G. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int.* 2009; 76:1258-1267.
- Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, Meer E, Peti-Peterdi J. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest.* 2008; 118:2526-2534.
- Vargas SL, Toma I, Kang JJ, Meer EJ, Peti-Peterdi J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:1002-1011.
- Prokai A, Peti-Peterdi J. Recent advances in tissue (pro)renin imaging. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010; 2:1227-1233.
- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 2002; 109:1417-1427.
- Deniz H, Oğütmen B, Cakalağaoğlu F, Tuğlular S, Ozener C, Akoğlu E. Inhibition of the renin-angiotensin system decreases fibrogenic cytokine expression in tacrolimus nephrotoxicity in rats. *Transplant Proc.* 2006; 38:483-486.
- Hamar P, Peti-Peterdi J, Rázga Z, Kovács G, Heemann U, Rosivall L. Coinhibition of immune and renin-angiotensin systems reduces the pace of glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 11:S234-238.
- Szabo A, Lutz J, Schleimer K, Antus B, Hamar P, Philipp T, Heemann U. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int.* 2000; 57:982-991.