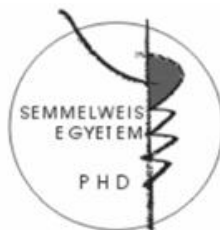


A nitrogén-monoxid szintáz enzimek vizsgálata hipoxia által kiváltott kórképekben

Doktori tézisek

Dr. Rusai Krisztina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Prof. Reusz György egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Szabó Attila egyetemi docens, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Fekete György egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens
Dr. László Lajos egyetemi docens

Budapest
2008

1. Bevezetés

Az iszkémia indukálta patofiziológiai folyamatok számos klinikai kórkép kialakulásában játszanak jelentős szerepet, így az iszkémiás szervkárosodások kiemelkedő mértékben járulnak hozzá a betegek morbiditásához és mortalitásához.

A nitrogén-monoxid (NO) az emlős szervezetben termelődő multifunkcionális jelátvivő molekula, mely többek között központi szerephez jut a hipoxiára/iszkémiára válaszként megjelenő adaptációs, valamint patológiás folyamatokban.

A NO szintézisét L-argininből az ún. nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim végzi, melynek három különböző – neuronális (nNOS), indukálható (iNOS), illetve endoteliális (eNOS)- izoformája létezik.

A NO különböző patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepe, mivel önálló receptorral nem rendelkezik, alapvetően attól függ, hogy melyik izoforma szintetizálja, illetve milyen más mediátorok vannak jelen a környezetében.

Kiemelkedő szerephez jut a neurotranszmisszióban, a gyulladásoz válaszreakció, valamint az érújdonképződés szabályozásában.

Az akut veseelégtelenség 70-80%-ának kialakulásáért a vese iszkémiás károsodása felelős, melynek gyógyítása jelenleg is tüneti kezelésre szorítkozik.

Szervtranszplantáció esetében a graftot ért iszkémiás károsodás mai ismereteink szerint a korai és késői graftműködés egyik legfontosabb ún. nem-alloantigén függő rizikófaktora. A donorból eltávolított szerv az azonnali hűtés és gondos perfundálás ellenére is az iszkémiás károsodás jeleit mutatja. A recipiens szervezetében az iszkémiát követő reperfüzió akut gyulladásoz választ indukál, mely a graftműködés késői megindulását okozhatja és a krónikus allograft nefropátia kialakulásában játszik szerepet.

A koraszülöttek retinopátiája (retinopathy of prematurity - ROP) a retina kis ereinek rendellenes növekedésével és kóros proliferációjával járó igen súlyos kórkép, mely az 1250 g alatti születési súlyú koraszülöttek mintegy 50%-át érinti.

A fejlődésben levő retina a magzati élet 36. hetéig igen érzékeny a relatív hiperoxiára. Az éretlen, kissúlyú koraszülöttek esetében a megszületést követően a magzati élethez képest a retinában hirtelen megemelkedik az oxigén szöveti nyomása. Az így kialakult relatív szöveti hiperoxia a már meglévő retina erek elzáródását (vazo-obliteráció) okozza.

A vazo-obliteráció következtében kialakult retinális iszkémia kóros vaszkulo- és angiogenezist indukál (proliferatív retinopátia). E szabálytalan, gyors növekedés során a kis erek bevérezhetnek, ami hegesedéshez vezet. A legsúlyosabb esetben a folyamat a retinát leválaszthatja a szemfenékről és vakság alakulhat ki.

Mind az iszkémia okozta akut vesekárosodás, mind a ROP pathomechanizmusa egymással összefüggő kaszkád mechanizmusok sorából áll, melyek szabályozásához a NO több ponton is kapcsolódik.

2. Célkitűzés

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy milyen hatást fejt ki a NO szubsztrát L-arginin és a szelektív nNOS gátlószer 7-nitroindazol (7-NI) a vese iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása során.

Ezenkívül vizsgáltuk az eNOS gén két funkcionális genetikai polimorfizmusának a kissúlyú koraszülöttek retinopátiájának kockázatával való kapcsolatát. Legfontosabb kérdéseim a következők voltak:

1. Kimutatható-e a 7-NI vesekárosodásra gyakorolt hatása I/R károsodás során?
2. Kimutatható-e az L-arginin vesekárosodásra gyakorolt hatása I/R során?
3. Hogyan változik a NOS enzimek mRNS és fehérje expressziója vese I/R során, valamint L-arginin és 7-NI kezelést követően?
4. Van-e kapcsolat a kis születési súlyú koraszülöttek retinopátia kockázata és az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusai között?

3. Módszerek

3.1. In vivo vese I/R állatmodell

3.1.1. Az I/R vesekárosodás műtéti protokollja

Kísérleteinket ivarérett hím Sprague-Dawley patkányokon végeztük. A műtéti beavatkozást intraperitoneális nátrium-pentobarbitál (50 mg/ttkg,) anesztéziában végeztük.

A műtét elvégzése alatt az állatok rektális hőmérsékletét állandó $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Kísérleteink során 50 perces iszkémiás időt alkalmaztunk.

Az altatást követően medián laparotomiát végeztünk. A bal vesét ellátó artériát és vénát kipreparáltuk, majd 50 percre atraumatikus, mikrovaskuláris klippel leszorítottuk. Az iszkémiás idő végezte előtt az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. A klip felengedése után a műtéti nyílást véglegesen zártuk. A fenti műtéti beavatkozást követően 24 óra reperfüziós idő elteltével az állatokat újra elaltattuk, majd kivéztettük.

Kontrollként uninefektomizált, áloperált, nem-iszkémizált hím állatok szolgáltak.

3.1.2. Kezelési csoportok

Az L-arginin és a nNOS gátlás hatásának vizsgálata céljából kísérleteinket az alábbi csoportokon végeztük úgy, hogy minden csoportba hét állatot vontunk be.

Az állatok első csoportja vivőanyag kezelést (DMSO és szezám olaj) kapott (I/R+veh csoport). A második csoportot L-argininnel kezeltük az iszkémia indukciója előtt hét napon át napi egyszeri, 2 g/ttkg adagban intraperitoneálisan (I/R+L-arg). A harmadik csoport szelektív nNOS gátlószert, 7-nitroindazolt (7-NI) kapott 7 napon át 50 mg/ttkg dózisban

intraperitoneálisan az iszkémiát megelőzően (I/R+7-NI). Az állatok egy csoportja áloperáción esett át kezelés nélkül (sham).

3.2. Szérum kreatinin és karbamid (BUN) mérése

A vizsgált posztisztkémiás időpontban az aorta abdominalisból vett vérből fotometriás módszerrel meghatároztuk a kreatinin és urea nitrogen (BUN) értékeket.

3.3. A veseszövetek szövettani vizsgálata

A szövetmintákat perjódsavas Schiff reakcióval (PAS) és hematoxillin eozinnal (HE) festettük meg. A szöveti károsodás (glomeruláris és a tubuláris károsodások, illetve a vaszkuláris károsodás) mértékét minősítettük.

Az apoptózist kísérő DNS fragmentáció kimutatására TUNEL festést használtunk. A pozitív, apoptotikus sejtek számát 40x nagyításon fénymikroszkóp alatt látóterenként számoltuk meg.

3.4. RT-PCR vizsgálatok

A szövetminták teljes RNS tartalmát izoláltuk és komplementer (c)DNS-t konvertáltunk.

A cDNS mintákat nNOS, iNOS, eNOS és GAPDH specifikus primerekkel amplifikáltam. A keletkezett termékeket ethidium-bromiddal festett 2,5%-os agaróz gélen szeparálva tettük láthatóvá.

A PCR reakciók eredményeit Gel-Pro™ denzitometriációs szoftverrel értékeltük ki.

3.5. Western Blot

A Western blot vizsgálatokhoz a veseszövetet hűtött lizáló pufferben kézi homogenizálóval homogenizáltuk. A fehérje mintákat forralással denaturáltuk.

A mintákból 50-50 μg összfehérjének megfelelő mennyiséget vittünk fel 12,5 % SDS-poliakrilamid gélekre és gélelektroforézist végeztünk.

A fehérje mintákat az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra elektroblottoltuk hűtött rendszerben. A blottmembránt $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, egy éjszakán keresztül blokkoló oldatban inkubáltuk.

Blokkolás után a membránt mosó oldatban inkubáltuk az első specifikus ellenanyaggal. Primer patkány ellenes anti-iNOS és anti-eNOS ellenanyagként egér monoklonális ellenanyagot alkalmaztunk. Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal konjugált anti-egér IgG antitestet használtunk. Mosást követően a másodlagos ellenanyaggal a membránokat inkubáltuk.

Az immunoreaktív helyek kemolumineszcens szignálját filmen detektáltuk, majd Gel-ProTM szoftver alkalmazásával denzitometráltuk.

3.6. Allélspecifikus PCR vizsgálatok

3.6.1. Betegcsoportok

105 ROP miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval kezelt, illetve 127 krioterápiás, illetve fotokoagulációs kezelést nem igénylő ROP-ban szenvedő kis születési súlyú koraszülött (LBW) esetében határoztuk meg a eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok előfordulását. A betegek klinikai adatait a 2. táblázatban foglaltam össze.

	ROP miatt nem kezelt kisműlyű koraszülöttek	ROP miatt kezelt kisműlyű koraszülöttek	P érték
Betegek száma	127	105	
Fiú/lány	60/67	67/38	0,017
Születési kor (hét)	30,5±3,5	28,4±2,5	0,0001
Születési súly (g)	1300±400	1150±360	0,003
Oxigén terápia időtartama (nap)	7 [0-47]	15 [0-92]	0,0001

2. táblázat Az eNOS T^{-786C} és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusainak vizsgálatába bevont 232 kis születési súlyú koraszülött klinikai adatai.

3.6.2. Az eNOS T^{-786C} és 27-bp repeat polimorfizmusok detektálása

A szükséges genomiális DNS-t szűrőpapírra vett vérből izoláltuk. Az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus és eNOS T^{-786C} polimorfizmust allélspecifikus PCR reakcióval detektáltuk. A keletkezett termékeket ethidium-bromiddal festett 3%-os agaróz gélen detektáltuk.

3.7. Statisztikai analízis

Az állatkísérletes adatokat átlagérték ± SD (standard szórás) értéként adtuk meg.

A hisztológiai eredményeket Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Két csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

A különböző csoportok RT-PCR, Western blot eredményeinek összehasonlításához ANOVA tesztet használtunk Newman-Keul post-hoc tesztel kiegészítve.

A klinikai adatok összehasonlítását Student's t- tesztel végeztük.

A koraszülött populáció vizsgálata során az eNOS genetikai polimorfizmusainak allél és genotípus frekvenciáit, illetve haplotípus megoszlását χ^2 tesztel és Fisher exact tesztel vizsgáltuk.

Logisztikus regressziós analízist végeztünk annak érdekében, hogy az eNOS genotípusok és a ROP kezelés összefüggését megállapítsuk. Az asszociációt a ROP szakirodalom alapján ismert rizikó faktorokra (nem, születési kor, oxigén kezelés időtartama és a kettő interakciója) korrigáltuk. A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatát és ROP miatt kezelt, illetve a nem kezelt populáció allél prevalencia vizsgálatát az Arlequin™ szoftverrel (<http://lgb.unige.ch/arlequin/>; [Swiss National Science Foundation](#)) végeztük.

A statisztikai elemzések végrehajtásához a STATISTICA.6 szoftvert (StatSoft® Inc., USA) használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

4.1. Az L-arginin és 7-NI kezelés hatása a vese I/R károsodására

4.1.1. Vesefunkciós paraméterek

Az iszkémiás inzultust követően mindhárom csoportban szignifikánsan emelkedett szérum kreatinin és BUN értéket találtunk az áloperált állatokhoz képest.

Nem találtunk azonban különbséget az I/R kezelési csoportok és a vivőanyag kezelt (I/R+veh) állatok között ($P>0,05$).

4.1.2. A vese szövettani vizsgálata

Mindhárom I/R csoportban súlyos iszkémiás károsodás szöveti képe alakult ki az áloperált állatokhoz képest.

Súlyos tubuláris nekrozis, a vesetubulusokban hialin felszaporodása, a glomerulusok összeesése, illetve vaszkuláris károsodás alakult ki.

Nem találtunk ugyanakkor különbséget a kezelési csoportok és a vivőanyag kezelt I/R csoport között a szöveti károsodás mértékét illetően ($P>0,05$).

4.1.3. TUNEL-festés

A TUNEL festés segítségével meghatározott apoptotikus sejtek száma szignifikánsan magasabb volt az iszkémiás károsodást szenvedett patkányok veséjében áloperált állatokhoz képest ($P<0,01$).

Nem találtunk ugyanakkor különbséget a kezelt csoportok és a vivőanyag kezelt I/R állatok között az apoptotikus sejtek számában ($P>0,05$).

4.1.4. A NOS izoformák mRNS és fehérje expressziója

4.1.4.1. Az I/R hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

A nNOS mRNS expressziója szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$), az iNOS mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett ($P < 0,05$), ugyanakkor az eNOS mRNS expressziója nem változott az I/R+veh csoportban sham operált állatokhoz képest.

Az iNOS fehérje expressziója az mRNS expresszióknak megfelelő mértékben emelkedett ($P < 0,05$), az eNOS fehérje expressziója szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$) az I/R+veh csoportban áloperált állatokhoz viszonyítva.

4.1.4.2. Az L-arginin hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

L-arginin alkalmazása mindhárom NOS enzim izoforma mRNS expresszióját növelte a vivőanyag kezelt I/R csoporthoz képest ($P < 0,05$).

Ezzel szemben a vizsgált NOS izoformák közül csak az iNOS fehérje expressziója emelkedett szignifikánsan az L-arginin kezelt csoportban ($P < 0,05$), az eNOS fehérje expressziójában nem találtunk szignifikáns különbséget a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($P > 0,05$).

4.1.4.3. A 7-NI hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

A 7-NI kezelés csökkentette a nNOS mRNS expresszióját ($P < 0,01$ vs. I/R+veh), de nem gyakorolt hatást az iNOS és eNOS mRNS expressziójára vivőanyaggal kezelt állatokhoz képest ($P > 0,05$).

A 7-NI kezelt állatokban az iNOS fehérje expressziója csökkent ($P < 0,05$ vs. I/R+veh), míg az eNOS fehérje szintézise nem változott a vivőanyag kezelt patkányokhoz képest ($P > 0,05$).

4.2. Az eNOS 27-bp repeat és T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmusok gyakorisága és a koraszülöttek retinopátiája közötti kapcsolat

Az allélspecifikus PCR reakció segítségével végzett genotipizálás során az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus genotípus eloszlása szignifikánsan különbözött a ROP miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttek között ($P=0,015$).

Ugyanakkor nem találtunk különbséget az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus megoszlásában a két vizsgálati csoport között ($P=0,984$).

Az eNOS 27-bp repeat és T polimorfizmusok allél frekvenciák meghatározása során azt találtuk, hogy sem az eNOS 27-bp repeat „a”, sem az eNOS ⁻⁷⁸⁶C mutáns allél frekvenciája nem különbözött a két vizsgálati csoportot összehasonlítva ($P=0,153$ és $P=0,867$).

Logisztikus regressziós vizsgálat segítségével ki tudtuk mutatni, hogy a homozigóta mutáns aa genotípus és a kezelést igénylő ROP kialakulása között szignifikáns összefüggés van ($P=0,047$ vs. ab genotípus és $P=0,022$ vs. bb genotípus).

Továbbá eredményeink azt mutatták, hogy a fiú nem és a ROP kialakulása között is kapcsolat van ($P=0,046$ vs. lányok).

5. Eredmények összefoglalása, következtetések

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a nNOS mRNA expressziója csökken, az iNOS mRNA expressziója emelkedik, az eNOS mRNA expressziója nem változik az iszkémiás inzultust követően 24 órával patkány veseszövetben.

Megfigyeltük, hogy az iNOS fehérje expressziója az mRNA expresszió változásának megfelelően szintén emelkedik 24 óras reperfüziót követően a vesében. Az eNOS fehérje szintjében szignifikáns csökkenést detektáltunk.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az iszkémiás inzultus kiváltása előtt 7 napig szájon át végzett L-arginin kezelés nem változtatja meg a vese iszkémia/reperfüzió által kiváltott károsodásának mértékét patkány modellben.

Vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy az L-arginin kezelés megnövelte mindhárom NOS izoforma (nNOS, iNOS és eNOS) mRNA expresszióját vivőanyag kezelt állatokhoz képest. Az L-arginin kezelés az iNOS fehérje szintézisét megemelte, míg az eNOS esetében fehérje expressziós szinten nem tudtunk változást detektálni.

Kísérleteink bebizonyították, hogy a 7-NI szelektív nNOS gátlószerrel az iszkémiás inzultus előtt 7 napon át végzett előkezelés nem befolyásolja a vese I/R károsodás kimenetelét. A 7-NI kezelés csökkentette a nNOS mRNA expresszióját, ugyanakkor nem változtatta meg az iNOS és eNOS mRNA szintézisét a vesében 24 óras reperfüziót követően vivőanyag kezelt állatokhoz képest. A 7-NI kezelés csökkentette az iNOS fehérje expresszióját a vesében az iszkémiát követően 24 órával.

Munkánk második részében elsőként tudtuk kimutatni, hogy az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus a kezelést igénylő ROP kialakulásának független rizikófaktora.

Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a ROP kialakulása és az eNOS T⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmus között.

Vizsgálataink alapján következtetésként levonhatjuk, hogy az L-arginin kezelés posztisztkémiás károsodásra kifejtett hatása részben a NO rendszeren keresztül valósul meg, de nem játszik központi szerepet a károsodás kivédésében.

Eredményeink továbbá utalnak arra, hogy a nNOS izoforma nem játszik központi szerepet a vese I/R károsodás patomechanizmusában.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a 27-bp repeat genetikai polimorfizmus hordozása egyéb kockázati tényezőktől függetlenül hozzájárulhat a ROP kialakulásához, megerősítve ezzel az eNOS angiogenezisben betöltött szerepét.

Ugyanakkor nem találtunk összefüggést az eNOS T⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmus és a ROP megjelenése között.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni **Tulassay Tivadar Professzor Úrnak**, hogy az általa vezetett PhD program résztvevője lehettem az I. Sz. Gyermekklinika nefrológiai kutatólaboratóriumában. Hálás vagyok a szakmai és az anyagi háttér biztosításáért, mely folyamatosan lehetővé tette, hogy PhD munkám éveit egy nemzetközi szinten is elismert laboratóriumban tölthessem.

Hálával tartozom témavezetőimnek, **Prof. Reusz Györgynek** és **Dr. Szabó Attilának**, hogy tudományos pályámon elindítottak. Köszönöm nekik, hogy munkám során támogatásukra bármikor számíthattam, és hogy a kutatómunka szakmai és technikai feltételeit megteremtették számomra. Külön köszönettel tartozom **Dr. Szabó Attilának** a munkatervem kidolgozásában és a kutatómunkám során nyújtott folyamatos metodikai segítségért és hogy megteremtette számomra annak lehetőségét is, hogy számos szakmai konferencián részt vehessek.

Köszönöm **Dr. Vannay Ádámnak**, **Dr. Fekete Andreának** és **Dr. Müller Veronikának**, hogy megtanítottak a kutatómunka lépéseire a molekuláris biológiai metodikák alkalmazásától egészen az eredmények publikálásáig.

Köszönettel tartozom **Dr. Vásárhelyi Barnának**, **Prof. Szabó Andrásnak** és **Prof. Arató Andrásnak** a biztató szavakért, az önzetlen szakmai és emberi segítségért.

Köszönöm **Dr. Szebeni Beátának** és **Dr. Prókai Ágnesnek**, hogy a tudományos kísérletek elvégzésében, valamint a közlemények publikálásában segítségemre voltak.

Külön köszönöm, **Dr. Vásárhelyi Barnának**, **Dr. Dunai Györgynek** és **Dr. Treszl Andrásnak** a koraszülött beteganyag gyűjtésében

és a humán genetikai vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket.

Köszönöm **Dr. Bokodi Gézának, Dr. Borgulya Gábornak** elengedhetetlenül fontos támogatásukat a statisztikai elemzésekben.

Köszönöm az I. Sz. Gyermekklinika kutatóinak, **Dr. Bányász Ilonának, Dr. Derzbach Lászlónak, Dr. Balogh Ádámnak, Dr. Kis Évának, Sziksz Ernának és Dr. Cseprekál Orsolyának**, hogy baráti, segítőkés társaságukban, mindenkor jó hangulatban végezhettem PhD munkámat.

Köszönöm **Bernáth Máriának** a kitűnő technikai asszisztenciát és hogy önzetlen segítségére mindig számíthattam.

Külön köszönettel tartozom **Prof. Uwe Heemannak és Dr. Jens Lutznak** a lehetőségért, hogy az általuk vezetett kutatólaboratóriumban néhány hónapot tölthettem és külön köszönöm azt a metodikai tudást, amivel a velük végzett közös munka alatt gazdagodhattam.

Végezetül nagyon nagy hálával tartozom szeretett szüleim és nagyszüleim felé a mindenkor megértésükért és türelmükért és hogy segítségükre mindig számíthattam.

A szerző disszertációhoz kapcsolódó publikációi

Rusai K, Fekete A, Szebeni B, Vannay A, Bokodi G, Müller V, Vicklicky O, Bloudickova S, Rajnoch J, Heemann U, Reusz Gy, Szabó A, Tulassay T, Szabó AJ. Effect of neuronal nitric oxide synthase inhibition and L-arginine supplementation on renal ischemia/reperfusion injury and renal nitric oxide system. Article accepted for *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Jun 1. **IF:** 1,78

Rusai K, Vannay A, Szebeni B, Fekete A, Borgulya G, Vasarhelyi B, Tulassay T, Szabo AJ. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T-786C and 27-bp Repeat Gene Polymorphisms in Retinopathy of Prematurity. *Mol Vis*. 2008;14:286-90. **IF:** 2,377

Disszertációtól független publikációk jegyzéke

Rusai K, Huang H, Sayed N, Strobl M, Roos M, Schmaderer C, Heemann U, Lutz J. Administration of Interleukin-1 Receptor Antagonist Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transpl Int*. 2008;21: 572-80. **IF:** 2,146

Fekete A, Vannay A, Ver A, **Rusai K**, Muller V, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ. Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291(4): 806-11. **IF:** 4,199

Fekete A, Viklicky O, Hubacek JA, **Rusai K**, Erdei G, Treszl A, Vitko S, Tulassay T, Heemann U, Reusz G, Szabo AJ. Association between heat

shock protein 70s and toll-like receptor polymorphisms with long-term renal allograft survival. *Transpl Int.* 2006;19(3):190-6. **IF:** 2,146

Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, **Rusai K**, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):34-41. **IF:** 2,518

Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, **Rusai K**, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45(2):187-93. **IF:** 2,077

Szebeni B, Szekeres R, **Rusai K**, Vannay A, Veres G, Treszl A, Arató A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42(1):27-31. **IF:** 2,077