

Akadémiai Doktori Értekezés Tézisei

**Új molekuláris mechanizmusok és terápiás lehetőségek a
diabéteszhez társuló sokszervi szövődmények kezelésében**

Fekete Andrea

2020



I. ELŐZMÉNYEK ÉS IRÁNYVONALAK

Tudományos fokozatot 2004-ben szereztem, doktori értekezésem témája a vese iszkémiás károsodását kísérő molekuláris biológiai változások és nemi különbségek vizsgálata volt. Doktori védésemet követően továbbra is a nefrológia határozta meg klinikusi és kutatói érdeklődésemet. Az akut vesekárosodás mellett, egyre inkább a krónikus vesekárosodás patomechanizmusával foglalkoztam, különös tekintettel a renin-angiotenzin aldoszteron rendszer (RAAS) szerepére.

2011-ben Lendület ösztöndíjat nyertem, kutatásaim inentől a diabétesz (DM) okozta sokszervi szövődmények, elsősorban a vesekárosodás (DKD) patomechanizmusainak leírására és új terápiás lehetőségek felfedezésére irányultak. MTA doktori értekezésem – néhány korábbi kísérleti eredménnyel kiegészítve – ezt a témát mutatja be részletesen.

A DM a lakosság közel 10%-át érinti; hatalmas egészségügyi és gazdasági és terhet jelent világszerte. A cukorbetegség szövődményei határozzák meg a betegek életminőségét és várható élettartamát. A DKD a felnőttkori krónikus veseelégtelenség egyik elsődleges oka, a depresszió előfordulása az átlagpopuláció többszöröse. Napjainkban a szoros vércukor-kontroll jelenti a terápia alapját, de a szövődmények kezelés továbbra sem megoldott, a pszichés zavarok pedig sokszor diagnosztizálatlanok maradnak. A veseelégtelenség progressziója transzplantációt tehet szükségessé, ahol a graftműködés hosszútávú megőrzése elsődlegesen fontos mind az életminőség, mind a mortalitás csökkentésének szempontjából. A beültetett vese hosszútávú túlélését a tárolás és a transzplantáció során elszenvedett oxigénhiányos károsodás nagyban meghatározza.

Az értekezés tárgyalja a cukorbetegséghez társuló depresszió patomechanizmusát, különös tekintettel a Sigma-1 receptor (S1R) és egyes neuroplaszticitásban fontos fehérjék (brain derived neurotrophic factor – BDNF) változásaira. Részletesen vizsgálja a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAAS) szerepét a depresszióhoz kapcsolódó neuroinflammációban, illetve bemutatja a RAAS gátlók (RAASi) antidepresszánsként történő alkalmazásának lehetőségeit.

A dolgozat leírja a DKD funkcionális és strukúrális eltéréseit, középpontba állítva a renális fibrózis folyamatát, tanulmányozza több kezelési lehetőség: a RAASi, az szérum-glükóz kotranszporter (SGLT) inhibitor dapagliflozin, és a S1R agonisták lehetséges renoprotektív hatásait.

A kísérletek harmadik része a transzplantáció során jelentkező, a beültetett szerv későbbi funkcióját meghatározó iszkémia/reperfúziós károsodás (IRI) csökkentésének új lehetőségeit elemzi, elsősorban a prezervációs folyadék S1R agonistákkal történő kiegészítését.

Kísérleteim során mindig azt tartottam szem előtt, hogy az alapkutatási eredmények lehetőleg a nem olyan távoli jövőben klinikailag alkalmazható, terápiában használható eredményt hozzanak. A dolgozatban bemutatott adatokon alapuló két szabadalom hasznosításával erre teszünk a közeljövőben kísérletet.

II. CÉLKITŰZÉSEK

In vitro körülmények között, illetve rágszálómodelleken az alábbi kérdésekre kerestük a választ a három fő vizsgálati témakörben:

T1DM és DEPRESSZIÓ

1. T1DM-ben a krónikus hiperglikémia következtében kialakul-e depresszió az állatokban?
2. Szerepet játszik-e a S1R-BDNF jelátviteli útvonal a T1DM indukálta depresszió mechanizmusában?
3. Hatékony-e a S1R agonista fluvoxamin T1DM asszociált depresszió kezelésében?
4. A T1DM-ben aktiválódó RAAS rendszer hozzájárul-e a depresszióra jellemző tünetek kialakulásához?
5. Milyen angiotenzin II -mediált molekuláris útvonalak játszhatnak szerepet a T1DM asszociált depresszió patomechanizmusában?
6. Hatékony-e a RAASi kezelés a T1DM-hez társuló depresszió terápiájában?

T1DM és DKD

7. A RAASi-k monoterápiában renoprotektív hatásúak-e a DKD kezelésében?
8. Csökkentik-e a RAASi-k a renális fibrózis kialakulását DKD kapcsán?
9. Milyen mechanizmusok játszhatnak szerepet a RAASi antifibrotikus hatásában?
10. Csökkenti-e az SLGT2 gátló dapagliflozin a DKD kialakulását?
11. Milyen hatásmechanizmusok állhatnak a dapagliflozin renoprotektív hatásának hátterében?
12. RAASi és SGLT gátló kombináció hatékonyabb-e a monoterápiánál?
13. Megtalálható-e a S1R a vesében?
14. Az S1R agonista fluvoxamin hatékony-e a DKD mérséklésében?

VESETRANSZPLANTÁCIÓ

15. Van-e nemi különbség a renális S1R fehérje jelenlétében, funkciójában fiziológias körülmények között, illetve renális IRI károsodást követően?
16. Renoprotektív hatású-e a S1R agonista kezelés a vese IRI károsodásával szemben?
17. Milyen molekuláris mechanizmusok játszhatnak szerepet a S1R agonista hatás kialakításában?
18. Mérsékelhető-e a vese hideg iszkémia alatt elszenvedett károsodása S1R agonista tartalmú prezervációs folyadékban történő tárolással?
19. Javítja-e a S1R agonista tartalmú prezervációs folyadék a beültetett graft állapotát transzplantációt követően?

III. MÓDSZEREK

III.1. *In vitro* modellek

Immortalizált human kidney 2 (HK-2) proximális tubulus sejteket vagy patkány normál vese fibroblaszt (NRK-49F) sejteket használtunk a molekuláris útvonalak vizsgálatához.

- A. Hiperglikémia:* A sejteket normál, magas glükóz koncentrációjú, ill. ozmotikus kontrollként magas mannitol koncentrációjú tápfolyadékban tenyésztettük 24 ill. 48 óráig.
- B. Fibrózis:* A sejteket PDGFB (10 ng/ml) vagy CTGF/CCN2 (10 ng/ml)-vel előkezeltük 24 óráig.
- C. Hipoxia:* „Bold line stage top” hipoxiás kamrában a sejteket 1% O₂ szint mellett tartottuk 2 óráig.
- D. Oxidatív stressz:* Hidrogén-peroxid (H₂O₂; 400 µM) hozzáadásával vizsgáltuk az oxidatív stressz hatását, a reakciót 30 perc után állítottuk le.

Az egyes kísérletsorozatokban az alábbi kezelési protokollok valamelyikét használtuk

Kezelési csoport	Kezelési koncentráció
Kontroll	5,5 mM glükóz
HG (magas glükóz)	35 mM glükóz
Mannitol	5,5 mM glükóz + 29,5 mM mannitol
HG+ENA	35 mM glükóz + 10 µM ENA
HG+RAM	35 mM glükóz + 10 µM RAM
HG+LOS	35 mM glükóz + 10 µM LOS
HG+SPI	35 mM glükóz + 200 nM SPI
HG+EPL	35 mM glükóz + 10 µM EPL
HG+DAPA	35 mM glükóz + 10 µM DAPA
HG+DAPA+LOS	35 mM glükóz + 10 µM LOS + 10 µM DAPA
E2	10 nM 17β-ösztadiol
E2+NE100	10 nM 17β-ösztadiol + 3 µM NE100
FLU	10 µM fluvoxamin
FLU+NE100	10 nM fluvoxamin + 3 µM NE100
FLU + AktIII	FLU + 10 µM AktVIII inhibitor
FLU + AktIV	FLU + 2 µM AktIV inhibitor

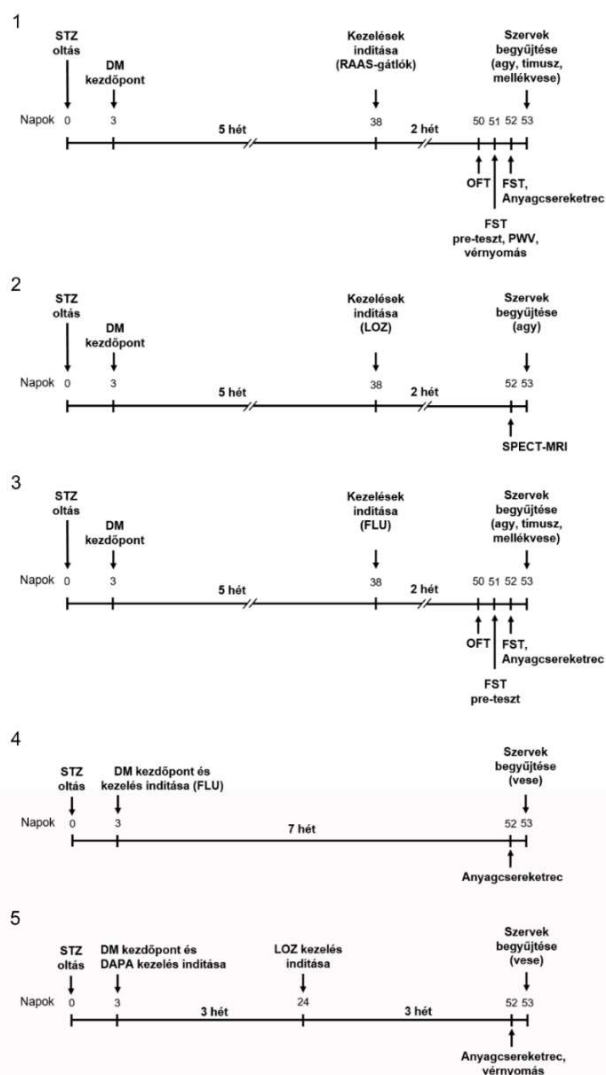
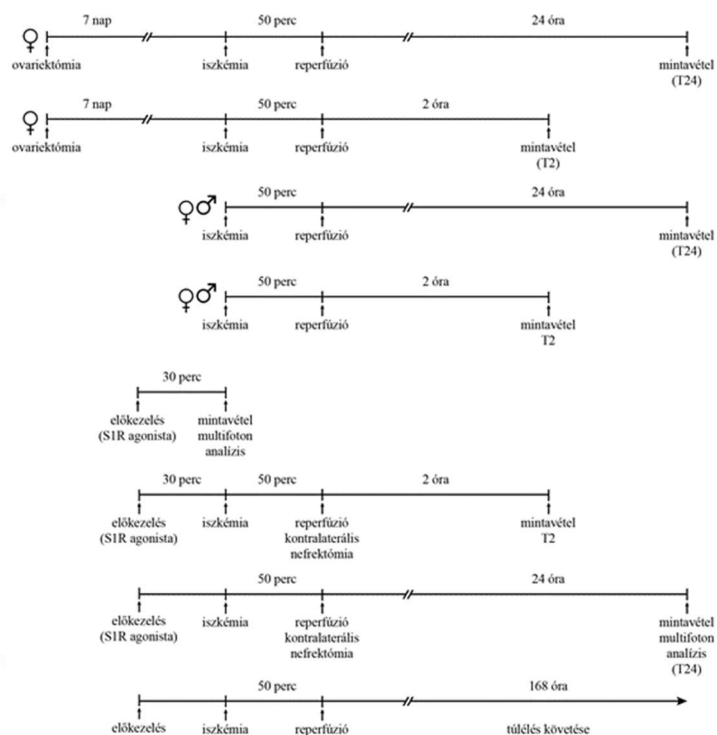
Rövidítések:

HG: magas glükóz,
 HG+ENA: Magas glükóz + Enalapril,
 HG+RAM: Magas glükóz + Ramipril,
 HG+LOS: Magas glükóz + Lozartán,
 HG+SPI: Magas glükóz + Spironolakton,
 HG+EPL: Magas glükóz + Eplerenon,
 HG+DAPA: Magas glükóz + Dapagliflozin,
 HG+DAPA+LOS: Magas glükóz + Dapagliflozin + Lozartán,
 E2: ösztrogén,
 NE100: ,N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoksi)-fenil]-etilamin monohidroklorid,
 FLU: fluvoxamin

III.2. *In vivo* modellek

Állatkísérleteinket a Magyarországon hatályos etikai engedélyek (1998/XXVIII.) betartásával végeztük, ivarérett, hím illetve nőstény Wistar patkányokon. Az állatokat ketrecenként hármával, állandó hőmérséklet, páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk, standard rágcsálótápot és friss csapvizet *ad libitum* biztosítottunk.

Az alábbi ábra sematikus összefoglalja az egyes kísérleti protokollokat.

A. T1DM modell**B. Renális IRI modellje****C. Vese autotranszplantáció modell**

Rövidítések: STZ: streptozotocin, DM: Diabetes mellitus, RAAS: renin-angiotenzin aldosteron rendszer, FLU: fluvoxamin, LOZ: lozartán, OFT: nyílt porond teszt (*open field test*), FST: erőltetett úszás teszt (*forced swim test*)

III.3. In vivo funkcionális mérések

- Két-foton mikroszkópia a renális perfúzió és a vesekárosodás meghatározására
- [^{99m}Tc]HMPAO és [¹²⁵I]CLINME izotópos SPECT-MRI az agyi perfúzió és neuroinflammáció mérésére
- Vérnyomás és pulzusmérés CODA Standard tail-cuff monitoringTM rendszerrel
- Erőltetett úszásteszt a depresszióra jellemző viselkedésmintázat elemzéséhez
- Porond teszt a lokomotoros aktivitás megítéléséhez

III.4. Szérumból, vizeletből laboratóriumi végzett mérések

- Fotometriás mérések: Meghatároztuk a szérum glükóz, fruktózamin, kreatinin, BUN, nátrium, kálium, klorid, albumin, összfehérje, triglicerid, összkoleszterin, HDL-koleszterin, GOT és GPT értékeket. Gyűjtött vizeletből kreatinin meghatározás után számoltuk a kreatinin-clearancet.

B. A BDNF, mikroalbumin, KIM-1 és NGAL koncentrációt szendvics ELISA módszerrel mértük. A renális fibrózis non-invazív biomarkereinek (uC3M, rPRO-C3, TUM, FBN és PRO-C4) meghatározásához a Nordic Bioscience saját fejlesztésű kitjét használtuk.

III.5. Hisztológiai és (fluoreszcens) immunhisztológiai vizsgálatok

A renális tubuláris károsodást és tubulus dilatációt hematoxin-eozin és PAS, a mezangiális mátrix expanziót PAS festett metszeteken értékeltük. A tubulointersticiális fibrózist Masson trikrom, a kollagén felhalmozódást Picrosirius red festéssel vizsgáltuk.

A fibronectin, O-GlcNAc, S1R, α SMA, Na/K ATPáz, HSP72, GFAP, P2Y12 p-CREB mennyiségét DAB kontrasztfestéssel vagy fluoreszcens immunohisztokémiával tanulmányoztuk. Az S1R, HSF-1 és HIF-1 α változásait a proximális tubulusban immunocitokémiával detektáltuk.

III.6. TUNEL próba

Az apoptózis kimutatását az Apoptag® Peroxidase Apoptosis Detection Kittel végeztük.

III.7. Molekuláris biológiai mérések

- A. qRT-PCR: Meghatároztuk az egyes gének mRNS expresszióját. A célgéneket Rn18S, RN18S vagy GAPDH háztartási génekre korrigáltuk. *(primer szekvenciák részletesen az értekezésben)*
- B. S1R géncsendesítés: A HK2 sejteket S1R-specifikus siRNS-el vagy nem kódoló, negatív kontroll siRNS-el transzfektáltuk. A géncsendesítés hatásfokát Western blottal ellenőriztük vissza.
- C. Western blottal mértük a fehérjék mennyiségi változásait, a jelintenzitást Ponceau S-sel festett összfehérje mennyiségre és belső kontrollra korrigáltuk. *(antitestek részletesen az értekezésben)*

III.7. Statisztikai kiértékelés

A minimális mintaszámot előzetes power analízissel számoltuk ki. Az adatok kiértékelését GraphPad statisztikai szoftverrel végeztük. Elsőként normalitástesztet végeztünk Kolmogorov és/vagy D'Agostino módszerrel, majd ennek függvényében egyutas ANOVA, Bonferroni vagy Kruskal-Wallis ill. Dunns féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. A túlélést Kaplan-Mayer analízissel (Log-rank teszt) értékeltük. Az eredményeket átlag $\pm$ SD vagy átlag $\pm$ SEM, illetve medián $\pm$ range formában adtuk meg a publikációt leközlő folyóirat elvárásaihoz igazodva. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

T1DM és Depresszió**1. STZ-indukált T1DM-ben depressziószerű viselkedés alakul ki, melyet a S1R agonista fluvoxamin kezelés mérsékel**

T1DM héthetes fennállását követően depresszió-szerű viselkedésmintázat alakult ki a patkányokban, melyet az erőltetett úszástesztben az immobilitási paraméter, a lebegés időszázalékának emelkedése jellemzett. A hiperglikémia, mint krónikus stressz a HPA-tengely túlműködését eredményezi, ami a kortikotropin releasing hormon termelődés fokozódása révén a neuroendokrin szervek változásához vezet. T1DM állatokban a mellékvese hipertrofizált, a tímusz tömege csökkent, ill. alacsonyabb BDNF szintet mértünk.

Igazoltuk, hogy a S1R agonista FLU terápia hatékony a T1DM-hez társuló depresszió kezelésében. Kimutattuk, hogy míg a 2 mg/ttkg FLU hatástalan, a 20 mg/ttkg dózis jelentősen csökkenti a depresszió-szerű viselkedést. Külön tanulmányozva az aktív mozgások egyes típusait nem találtunk különbséget a kezelési csoportok között. Az antidepresszáns hatás indirekt bizonyítására a lokomotoros aktivitást vizsgáló porond tesztet használtuk. T1DM patkányokban a FLU a lokomotoros aktivitást – tehát a fizikai erőnlétet – nem javította, de az úszástesztben csökkentette az immobilitás idejét, ez alátámasztja a kezelés antidepresszáns voltát. Az S1R antagonistá NE100 felfüggesztette a FLU hatását, ami arra utal, hogy az antidepresszáns hatás – legalábbis részben – S1R mediált.

T1DM indukált depresszióban elsőként igazoltuk, a FLU S1R-BDNF útvonalon keresztül kifejtett antidepresszáns hatását, illetve elsőként detektáltuk az egyes BDNF formák változását az agyszövetben. Kimutattuk, hogy a prefrontális kortexben és a hippocampusban, mind az össz, mind az izoforma-specifikus BDNF fehérjék, ill. a S1R megemelkedett, melyet a FLU kezelés csökkentett. Az mRNS expresszió nem változott, ami felveti, hogy a S1R a BDNF poszttranszlációs módosulásában játszik szerepet.

2. A RAASi kezelés antidepresszáns hatású T1DM-ben

Elsőként mutattuk ki a RAASi-k antidepresszáns tulajdonságát T1DM-ben, melyet igazolt, hogy az immobilitás a RAASi csoportokban csökkent. Az aktív szakasz egyes mintázatainak vizsgálatakor csak a RAM volt hatékony. Feltételezzük, hogy az egyes RAASi csoportok antidepresszáns hatása részben különbözik, ez magyarázza eltérő hatásukat a mozgásmintázatokat illetően. Fontos kiemelni, hogy bár kísérleti adataink szerint az MR antagonisták antidepresszáns hatásúak, az MR gátlása miatt a szervezet „relatív aldoszteron/kortikoszteron hiányt” érzékel, ezért a HPA-tengely aktivitását növeli. Mindezek miatt a depresszió klinikai kezelésében talán nem az MR antagonisták az ideális szerek.

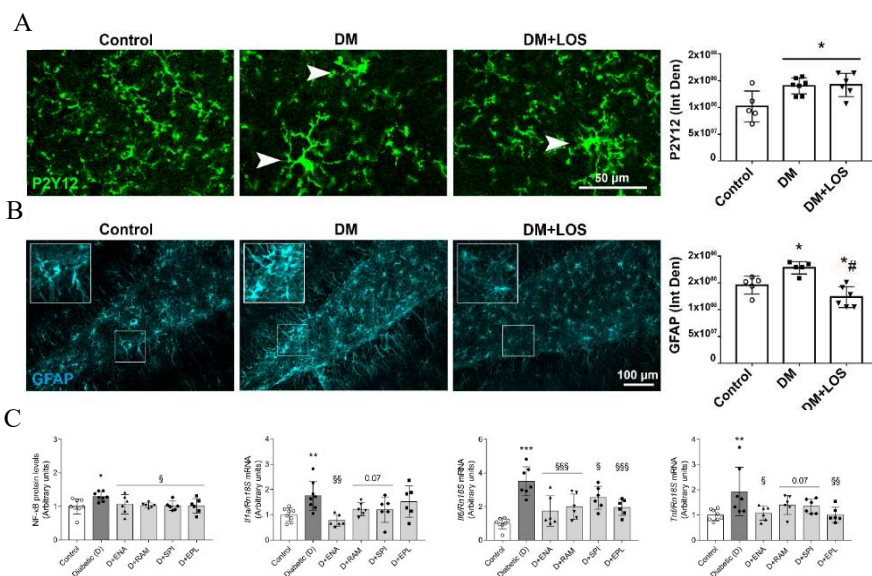
3. A RAASi kezelés antidepresszáns hatása független a vérnyomástól és az agyi perfúzió változásaitól

SPECT-MRI vizsgálatokkal igazoltuk, hogy, T1DM-ben az endotelin-1 és az aktiválódott RAAS lokális vazokonstriktort eredményez és csökken az agyi véráramlás. Kísérleteinkben a RAASi-k sem a véráramlást, sem az eNOS/nNOS útvonal enzimeinek mennyiségét nem változtatták. Annak fényében, hogy non-depresszor dózist használtunk ezek az eredmények nem meglepőek, és arra utalnak, hogy a RAASi kezelések antidepresszáns hatása független a szerek vérnyomáscsökkentő tulajdonságától.

4. A RAASi kezelés gátolja a hiperglikémia okozta neuroinflammációt

dc_1685_19

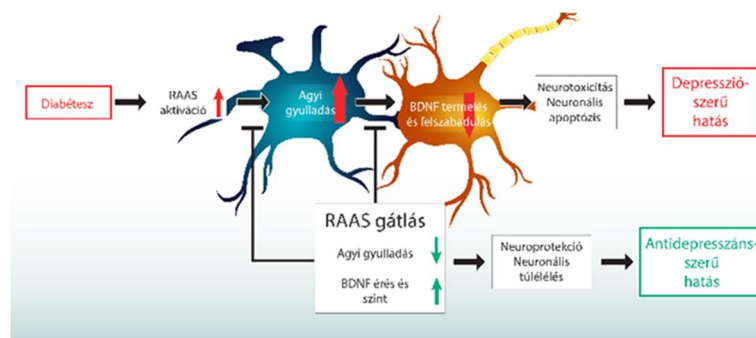
A T1DM állatokban detektált fokozott CLINME-TSPO felvétel, illetve a fluoreszcens GFAP festődés a mikroglia aktivációját jelezte, melyet a hippocampusban NF- κ B-mediált gyulladásos válasz kísért. A DM-ben emelkedett *Il1a*, *Il6* és *Tnf* szinteket a RAASi csökkentették.



5. A RAASi kezelés fokozza az agyi TrkB - ERK - CREB - Bcl2 szignalizációs útvonal aktivitását T1DM állatmodellben

A RAASi kezelések megakadályozták a T1DM-indukált BDNF csökkenést. Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a kezelések nem a T1DM által aktivált mikroglia, hanem az asztrociták BDNF termelésének növelésén keresztül fejtik ki protektív hatásukat. A proBDNF-ből érett BDNF formává történő poszttranszlációs átalakulást a különböző RAASi – k eltérő módon befolyásolták: az ACEi az MMP3, az MR antagonisták az intracelluláris furin, míg az ARBk mindkét enzim mennyiségét növelték. A hasítóenzimek aktiválása akár a RAASi kezelés új potenciális targetje is lehet a jövőben és felveti a kombinációs terápia szinergista hatásának lehetőségét az antidepresszáns hatékonyság növelése érdekében.

Az érett BDNF receptor TrkB mennyisége T1DM-ben csökkent, illetve párhuzamosan az általa aktivált jelátvitel főbb fehérjéinek (pERK1/2, pCREB), és az anti-apoptotikus *Bcl2* mRNS szintje is alacsonyabb volt. A RAASi-k – a ramipril kivételével – növelték a receptor mennyiségét és emelték a pERK1/2, CREB és *Bcl2* mennyiségét. A pro BDNF - p75Ntr -JNK -Bax szignáltranszdukciós útvonal elemei nem változtak sem T1DM, sem a kezelések hatására.



A RAASi kezelés feltételezett hatásmechanizmusa DM-hez társuló depresszióban

6. A non-depresszor dózisú RAASi kezelések mérséklék a vesefunkció beszűkülését és a szöveti fibrózist DKD-ban

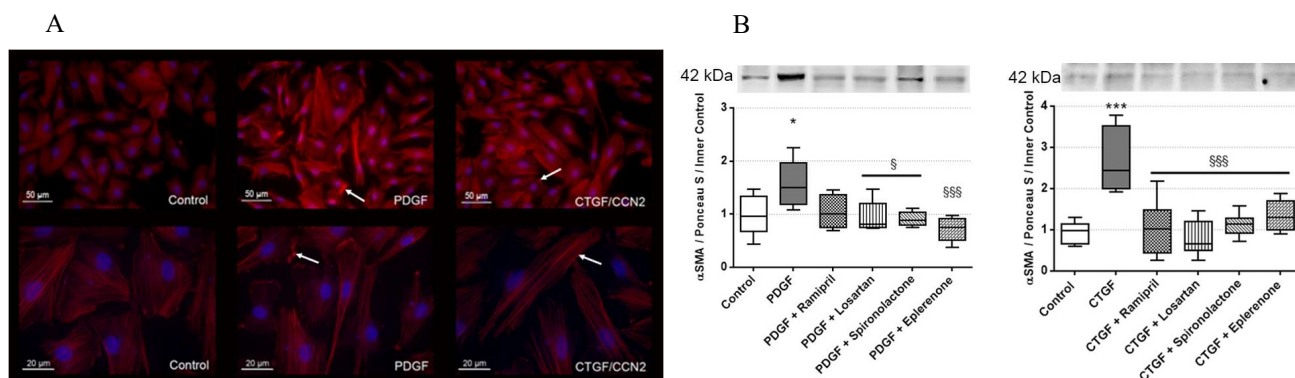
T1DM –ben a testsúlynövekedés elmaradt, a szérumban glükóz, fruktózamin, lipid és májenzim szintek emelkedtek. A RAASi kezelések nem befolyásolták a metabolikus paramétereket. A DKD kialakulását a vesefunkció romlása igazolta. 7 héttel a T1DM kialakulását követően csökkent a kreatinin clearance, fokozódott az albuminürítés. Az ENA, SPI és EPL javította a kreatinin clearancet, míg az összes RAASi kezelés csökkentette a BUN-t és az albuminúriát.

A RAASi kezelések mérsékeltek a mezangiális mátrix expansziót és a tubulointersticiális fibrózist, a kollagén és fibronectin felszaporodását. Ezzel párhuzamosan változott a vesében a miofibroblaszt marker α -SMA mennyisége. A *Tgfb1*, *Pdgfb* és *Ctgf* mRNS expressziója megemelkedett DKD-ban. A *Tgfb1*-et egyik RAASi sem, a *Pdgfb* és *Ctgf* szinteket az aldoszteron antagonisták csökkentették.

7. A RAASi kezelések direkt hatása a hiperglikémia indukált proximális tubulus sejtekre és renális fibroblasztokra

In vitro kísérleteinkben a hiperglikémia növelte a proximális tubulus sejtek *TGFB1*, *PDGFB* és *CTGF* mRNS expresszióját, a RAASi kezelések a *PDGFB* és *CTGF* mRNS expressziót a kontroll szintjére csökkentették, míg a *TGFB1* nem változott.

A PDGFB és CTGF kezelés hatására renális fibroblasztok morfológiája megváltozott, megnőtt az F-aktin mennyisége, stressz kötegek és csomók alakultak ki. Ezzel párhuzamosan nőtt a sejtek α -SMA termelése, amit a RAASi kezelések csökkentettek.



A. Reprezentatív falloidin festett fluroeszccens immuncitokémiai képek, Piros – F-aktin, kék – sejtmag. A nyílak az aktin csomókat jelölik (400x és 1000x nagyítás, lépték: 50 ill. 20 μ m) **B.** α -simazizom aktin (α SMA) fehérjeszintek kontroll, (B) PDGFB-vel ill. (C) CTGF/CCN-nel kezelt, ill. ramiprillel, losartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt renális fibroblaszt sejteken. A felső paneleken reprezentatív gélképek. A fehérjeszinteket Ponceau-S-re normlizáltuk. (N=6 well/csoport; * p <0,05 vs. kontroll (control), §§§ p <0,01 vs. PDGF vagy CTGF)

8. A hiperglikémia fokozza a fehérjék O-GlcNAcilációját *in vitro* és *in vivo* modellekben

A hiperglikémia hatására a proximális tubulus sejtekben megnőtt a fehérjék O-GlcNAcilációja, köztük az 140 kDa molekuláris tömegű tartományba tartozó eNOS proteiné is. Elsőként mutattuk ki proximális tubulus sejtekben a különböző szubsztrát-specifitással és intracelluláris funkciókkal rendelkező nukleocitoplazmatikus és mitokondriális OGT izoformákat.

Igazoltuk, hogy hiperglikémia hatására az OGT időfüggő és izoforma-specifikusan változik: az mOGT szintje 24 órára nőtt, majd 48 órára normalizálódott. Az mOGT nem változott 24 óránál, azonban 48 órára a kontrollhoz képest csökkent.

T1DM-ben fokozódott a fehérjék *O*-GlcNacilációja, melyet az összes RAASi kezelés csökkentett. Az *O*-GlcNaciláció fokozódásával párhuzamosan az eltávolításért felelős OGA-L lecsökkent, míg a lipid-cseppekhez asszociált OGA-S mennyisége emelkedett a diabéteszes patkányokban. Az OGA-L csökkenését csak a LOZ védte ki, az OGA-S változását mindegyik RAASi kezelés a kontroll szintjére mérsékelte.

9. A RAASi kezelés mérsékli az eNOS foszforiláció csökkenését, megakadályozza a Na^+/K^+ ATPáz transzlokációját

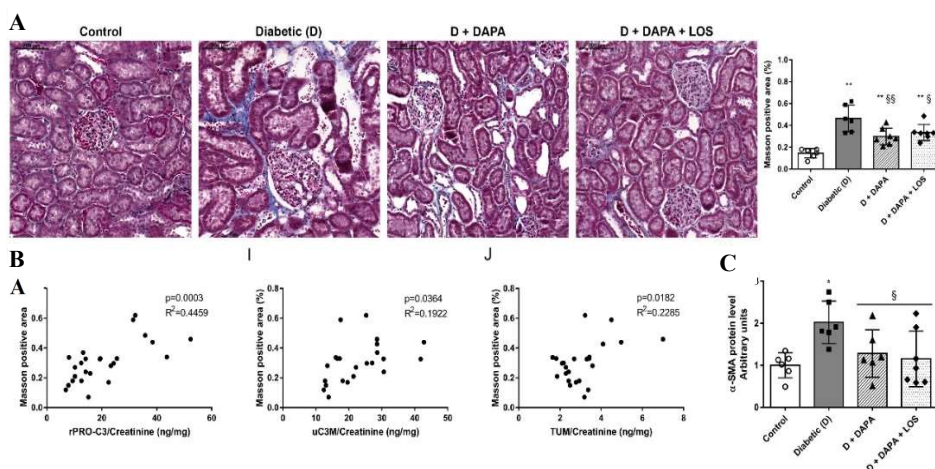
A hiperglikémia gátolta az eNOS foszforilációt, mind a proximális tubulus sejtekben, mind a cukorbeteg állatok veséjében, melyet a RAASi kezelések javítottak. Hiperglikémiában az Akt foszforilációja is zavart szenvedett, hiszen a magasabb Akt szintek ellenére a pAkt mennyisége nem változott. Mindezek alapján felmerül, hogy nem csak a peNOS direkt *O*-GlcNacilációja, hanem az Akt *O*-GlcNacilálódása is gátolja az eNOS foszforilációját és aktivációját.

Bár a RAASi terápiák a HSP72 szintjét érdemben nem változtatták, a kezelések - legnagyobb mértékben az MR antagonisták - csökkentették a NKA fehérje mennyiségét és megakadályozták az enzim transzlokációját a citoplazmába. Korábban leírták, hogy az ANGII gátolja az Akt-eNOS mediált bazolaterális lokalizációt, így az is elképzelhető, hogy a RAASi terápia ezen az útvonalon keresztül segíti a nátrium pumpa fiziológiás lokalizációjának fenntartását és a veseműködés megőrzését.

10. A DAPA kezelés renoprotektív és antifibrotikus hatású DKD-ban

Kimutattuk, hogy a DAPA kezelés hatékonyan és biztonságosan (súlyos hipo, ill. hiperglikémiás epizódok nélkül) csökkenti a vesefunkció romlását és a vese struktúrális károsodását.

Igazoltuk, hogy a DAPA csökkenti a DM indukálta fibrotikus választ, gátolja a profibrotikus *Ctgf* és *Pdgfb* termelődését, ezáltal mérsékli a miofibroblaszt átalakulást és az ECM komponensek (kollagének és fibronectin) termelődését. A DAPA antifibrotikus hatása tükröződött a vizeletben detektálható, non-invazív új biomarker Protein Fingerprint™ fehérjék mennyiségében: csökkent a rPRO-C3 és a TUM szintje, a javulás korrelált a szövettani mintákon észlelt eltérésekkel.



A. Reprezentatív Masson festett szövettani képek illetve fibrotikus terület kvantifikálása a teljes terület arányában (nagyítás 200x, lépték: 200 μm) **B.** korreláció a vizelet markerek és a Masson kiértékelés között, **C.** SMA fehérje mennyisége az egyes csoportokban Ponceau-S re korrigálva (átlag $\pm$ SD, N=6 kontroll és D csoport, N=7 kezelt csoport, * $p<0,05$ vs. kontroll, ** $p<0,01$ vs. kontroll, § $p<0,05$ vs. D, §§ $p<0,01$ vs. D)

11. A DAPA az O-glikoziláció gátlásával és a hipoxiás károsodás csökkentésével mérsékli a proximális tubulus sejtek károsodását

HK-2 sejteken és a teljes vesében egyaránt kimutattuk, hogy a DAPA kezelés csökkenti a hiperglikémia indukált O-GlcNAcilációt, elsősorban az OGT – vagyis a szintéziséért felelős enzim gátlásán keresztül. Ezzel párhuzamosan DAPA hatására a vesében csökkent a *Ctgf* és *Pdgfb* mRNS expresszió, míg a *Tgfb* mennyisége nem változott. *In vitro* kísérleteinkben igazoltuk, hogy a DAPA csökkenti a hipoxia-indukált *CTGF* és *PDGF* termelést, ami szintén arra utal, hogy a DAPA antifibrotikus hatása direkt kapcsolatban van a hipoxiás károsodás mérséklésével.

12. A S1R jelen van a vesében, a proximális tubulusban és a fibroblasztokban

Kutatócsoportunk elsőként írta le a S1R specifikus eloszlását az egyes nefronszegekmensekben. Kimutattuk, hogy a S1R jelen van a vesében, elsősorban a kortexben, de kisebb mértékben a medullában és a papillában is, a proximális tubulus sejtek és a renális fibroblasztok is expresszálják.

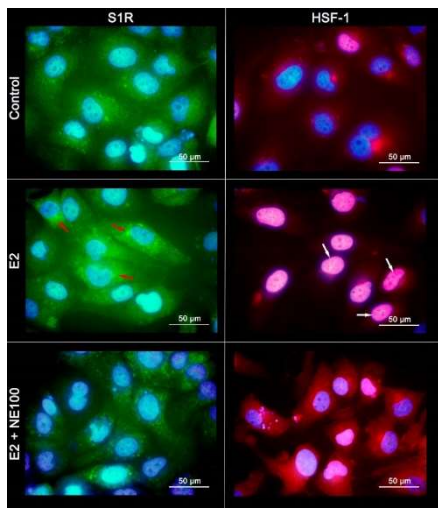
13. A S1R agonista FLU renoprotektív DKD-ban

Igazoltuk, hogy a S1R agonista FLU hatékony a DKD-ban jelentkező vesefunkció beszűkülés lassítására, javítja a retenciós paramétereket, mérsékli a mikroalbuminúriát. A funkcionális károsodás mellett a kezelés csökkentette a mezangiális mátrix proliferációt és a renális fibrózist.

A renoprotektív hatás dóziszfüggő módon érvényesült: a szokásos SSRI-ként használt dózisban (20 mg/ttskg) a kezelés minden paramétert javított, míg a kisebb 2 mg/ttskg adag a szövettani károsodás megelőzésében nem volt hatékony. A hosszútávú kezelés kedvezőbb, szinte minden paraméter tekintetében kétszer olyan hatékony volt, mint a kéthetes kezelés.

VESETRANSZPLANTÁCIÓ

14. Az ösztrogén aktiválja a S1R transzlokációját és a hősokk választ proximális tubuláris sejtekben és renális IRI –t követően



Kimutattuk, hogy az ösztrogén, mint a S1R ligandja proximális tubulus sejtekben a receptor perinukleáris régióból citoplazmába történő áthelyeződését indukálja. A HSF-1 intracelluláris lokalizációja is megváltozott az ösztrogén kezelés hatására, a citoszólból a sejtmagba helyeződött át, ahol fokozta a HSP72 és kisebb mértékben a HSP27 termelődését. A fehérjék emelkedését *in vitro* az NE100 kezelés felfüggesztette, ami a S1R mediált hatást támasztja alá. A nőstényekben magasabb HSF-1 és HSP szinteket mértünk, mint hímekben és az ovariectomizált csoportban, már a kontrollokban, illetve a posztisztkémiás periódusban is.

A piros nyilak a citoplazmában található S1R- (zöld), a fehér nyilak a sejtmagban található HSF-1 (piros) jelölik. nagyítás:100x; lépték: 50 μm

A HSPk a membránstruktúra helyreállításával komoly szerepet játszanak a NKA működésének megőrzésében. Mind az ösztrogén kezelt sejtekben, mind a nőstény állatokban a NKA

lokalizációja megtartottabb maradt. arra utal, hogy az ösztrogén – részben a S1R-on keresztül – aktivabb hősokk választ, ezáltal kedvezőbb chaperonfunkciót eredményez.

15. A S1R agonista DHEA javítja a posztiszkémiás túlélést, vesefunkciót és csökkenti a strukturális károsodást

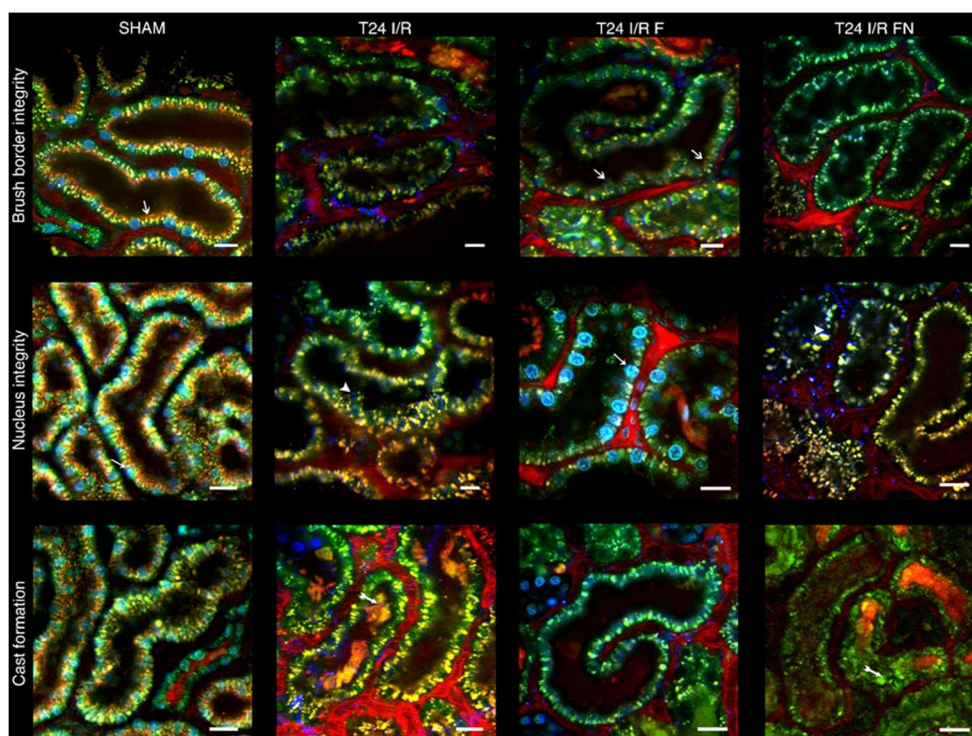
A DHEA előkezelés javította a patkányok túlélését a kezeletlen csoporthoz képest (medián túlélés: 72 vs. 36 óra). *In vivo* 2-foton mikroszkóppal IRI-t követően peritubuláris kapilláris átmérők csökkenését mértük. A DHEA kezelés javította a vesefunkciót és gátolta a peritubuláris vazokonstriktációt,

A funkcionális károsodást szövettani elváltozások is kísérték: a kefeszegély eltűnt, a proximális tubulusok nagy része nekrotizált, a lumenben jelentős szövettörmelék felhalmozódást figyeltünk meg. A DHEA előkezelés csökkentette a tubuláris károsodást. Mindez felveti, hogy a DHEA a renális perfúzió javítása révén renoprotektív IRI-t követően.

16. A FLU renoprotektív vese IRI-t követően

A FLU-val kezelt patkányok jelentősen jobb túlélést mutattak, mint a vehikulummal vagy FLU + specifikus S1R antagonistá NE100-al kezelték (medián túlélés: 67 versus 36 és 49 óra). 24 órával az inzultust követően a retenciós paraméterek, az AST, illetve a tubuláris károsodásra specifikus NGAL és KIM-1 emelkedés kisebb volt FLU-val kezelt csoportban. Az NE100 gátolta a javulást, ami S1R-mediált renoprotektív hatásra utal.

Mind a hagyományos hisztológiai vizsgálat, mind két-foton mikroszkópos képek alapján látszott, hogy a FLU kezelés jelentősen mérsékelte a tubuláris károsodást. Kimutattuk, hogy IRI-t követően FLU hatására az IL-1 α szintje kevésbé emelkedett, mint a kezeletlen állatokban, míg a másik fontos szabályozó citokin az IL-10 szintje nőtt. Egy héttel az IRI inzultust követően a vese struktúrája csaknem a kontrollokra jellemző, intakt képet mutatva, enyhe leukocita infiltráció utalt csak a lezajlott gyulladásra.



Representatív két foton mikroszkópos felvételek *in vivo*. Felső sor: fehér nyilak mutatnak a narancssárgával festődő (Texas Red) ép kefeszegélyre. A sejtmagok integritása látszik a középső sorban: kék - nukleusz: Hoechst 33342. Vékony fehér nyíl jelzi az ép sejtmagot, tömör kis nyíl a károsodott szétesett magokat. Alsó sor: nagymennyiségű nekrotikus szövettörmelék a tubuláris lumenben fehér nyíl mutat rá (N=3/csoport, lépték=25 μ m)

17. A S1R serkentése fokozza az Akt-peNOS közvetített vazodilatációt *in vitro* és *in vivo*

Feltételeztük, hogy a FLU kezelt csoportban észlelt kedvezőbb renális perfúzió a S1R-Akt-NO mediált vazodilatáció következménye. A FLU proximális tubuláris sejtekben növelte a peNOS (Ser1177); mennyiségét mind kontroll körülmények között, mind oxidatív stressz mellett. A FLU kezelés ellenére S1R hiányában (S1R géncsendesítés mellett) a peNOS mennyisége alacsony maradt, ami bizonyítja a S1R szabályozó szerepét. Az Akt upstream (AktIV) és downstream (AktVIII) gátlása csökkentette a peNOS mennyiségét és az NO termelést

A peritubuláris érátmérők változását 2-foton mikroszkóppal mértük A FLU fokozott peNOS és NO termelést, és a peritubuláris kapillárisok átmérőjének növekedését okozta mind fiziológiás körülmények között, mind 24 órával az IRI inzultust követően. Az NE100 és a különböző NOS inhibitorok meggátolták a vazodilatációt, ami arra utal, hogy a FLU hatása S1R által mediált és NOS függő folyamat.

Vizsgálatainkkal elsőként bizonyítottuk a S1R agonista FLU kezelés renoprotektív hatását a vese IRI károsodásának kivédésében. Eredményeink új molekuláris útvonal, a S1R transzlokáción keresztül megvalósuló, Akt - NO mediált vazodilatáció szerepét igazolták a kedvezőbb posztisztkémiás túlélés és vesefunkció háttérében, ami felveti a S1R, mint új ígéretes gyógyszer célpont relevanciáját az AKI terápiájában.

18. A FLU kezelés hatása a transzplantált vesében

A S1R agonista kezelés ígéretes eredményeiből kiindulva, a S1R agonisták alkalmazási lehetőségét autotranszplantált KTx modelljében is vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a S1R agonistát tartalmazó folyadékban (FLU, SA-4502, PRE) történő tárolás jelentősen csökkenti a beültetésre váró vese struktúrális károsodását, enyhébb a tubuláris dilatáció, mérsékeltebb az apoptózis.

A S1R agonisták renoprotektív hatása megmaradt a transzplantációt követően is. A poszttranszplantációs 24 órás vesefunkció romlása), illetve a korai tubulus károsodás (*Ngal*, *Kim-1* mRNS emelkedés) enyhébb volt azokban az állatokban, ahol a graftot a hideg iszkémia alatt FLU tartalmú prezervációs oldatban tároltuk.

A FLU-kezelt vesék PAS festett metszetein enyhébb hisztológiai károsodást figyeltünk meg. A glomerulusok intaktak voltak, a tubuláris plazma és sejtmagok normális festődést mutattak, a kefeszegélyek megtartottak voltak.

A funkcionális és hisztológiai károsodások javulása mellett, a S1R prezervációs folyadékban tárolt graftokban enyhébb volt az apoptózis és alacsonyabb volt egyes proinflammatorikus citokinek szintje is, ami a korábbi vizsgálatainkkal megegyezően a S1R agonisták anti-inflammatorikus hatását támasztja alá. Az SA-4502 kezelés sok paraméter tekintetében kedvezőbbnek bizonyult a FLU-nál.

Bizonyítottuk, hogy a S1R agonista kezelés javítja a beültetett vese rövid, és középtávú működését, csökkenti a műtét következtében létrejövő oxigénhiány okozta szöveti károsodást, elősegítve ezzel a transzplantáció sikerét.

V. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Doktori értekezésemben a cukorbetegség sokszervi szövődményeit, elsősorban a depresszió és a DKD új patomechanizmusait és kezelési lehetőségeit vizsgáltam. Az *in vitro* modellekben és diabéteszes, iszkémiás illetve transzplantációs kísérletekben tett legfontosabb megállapításaim a következők:

1. Megállapítottuk, hogy T1DM-ben a hiperglikémia depresszióra jellemző viselkedést és neuroendokrin változásokat indukál. Elsőként igazoltuk a S1R - BDNF jelátviteli útvonal, illetve a különböző BDNF izoformák szerepét a depresszió patomechanizmusában.
2. Kimutattuk, hogy a hosszútávú FLU terápia hatékony a T1DM-hez társuló depresszió kezelésében. Alátámasztottuk, hogy a FLU antidepresszáns hatásában a S1R aktivációja részt vesz.
3. Elsőként bizonyítottuk, hogy az ARB-k mellett, az ACEi-vel és MR antagonistákkal végzett hosszútávú kezelés is hatékony a T1DM-hez társuló depresszió terápiájában.
4. Igazoltuk, hogy mindegyik RAASi növeli a hippocampusban a TrkB - Erk - CREB - Bcl2 szignáltranszdukciós útvonal fehérjéinek mennyiségét, elősegítve az idegsejtek túlélését, regenerálódását és a szinapszisok formálódását. Kimutattuk továbbá, hogy a depresszió patomechanizmusában a pro-apoptotikus útvonal kevésbé jelentős és a RAASi antidepresszáns hatása is független a prekursor BDNF - p75Ntr - JNK -Bax jelátviteltől.
5. Leírtuk, hogy a non-depresszor dózisban, monoterápiában adott RAASi kezelések renoprotektívek, mérsékelik a vesefunkció beszűkülését és antifibrotikus hatásúak T1DM indukált DKD patkánymodellben. Kimutattuk, hogy az MR antagonisták monoterápiás hatékonysága megegyezik, sőt egyes paraméterek tekintetében meghaladja a többi RAASi készítményét, melynek hátterében az aldoszteron-szökés gátlása is feltételezhető.
6. Elsőként használtuk a non-invazív, Protein FingerprintTM peptideket DKD-ban az antifibrotikus terápia hatékonyságának követésére. Kimutattuk, hogy ezek a biomarkerek jól korrelálnak a hisztológia károsodással és megfelelően jelzik a renális fibrózis jelenlétét.
7. Igazoltuk, hogy a RAASi kezelés közvetlenül gátolja a fibroblaszt/miofibroblaszt transzformációt, ami felveti, hogy ezek a sejtek a RAASi primer terápiás célpontjaként is szolgálhatnak.
8. Leírtuk, hogy DKD-ban a glükotoxicitás közvetítésének egyik kulcsmechanizmusa a fehérjék fokozott az O-GlcNAcilációja. Elsőként mutattuk ki az O-GlcNAciláció enzimeinek különböző izoformáit és azok mennyiségének időfüggő változásait. Bizonyítottuk, hogy hiperglikémia hatására a peNOS szint csökken, melynek hátterében részben az enzim fokozott O-GlcNAcilációját feltételezzük.

- dc_1685_4.9 Megállapítottuk, hogy a RAASi kezelés a fehérjék *O*-GlcNAcilációját csökkenti. Kimutattuk, hogy a hatásért nem az OGT szint csökkenése, hanem az oldalláncok eltávolítását végző OGA-L növekedése felelős.
10. Igazoltuk, hogy hiperglikémiában a NKA funkciója károsodik, mert az enzim fiziológiás helyéről áthelyeződik a citoplazmába. A vele kolokalizáltan elhelyezkedő HSP72 szintje csökken, ami a glükotoxicitással szembeni sérülékenységhoz vezet. A RAASi kezelések a NKA transzlokációját kivédik.
 11. Kimutattuk, hogy a DAPA kezelés hatékonyan és biztonságosan (súlyos hipo, ill. hiperglikémiás epizódok nélkül) csökkenti a vesefunkció romlását és a vese struktúrális károsodását. A tubuluskárosodásra specifikus (KIM-1 és NGAL) szintek, valamint a vizelettel ürülő fibrózis biomarkerek (rProC3 és TUM) szintje szintén mérséklődik.
 12. Megállapítottuk, hogy a DAPA hatékonyan csökkenti a DM indukált fibrotikus választ, gátolja a profibrotikus *Ctgf* és *Pdgfb* termelődését, ezáltal mérsékli a miofibroblaszt átalakulást és az ECM komponensek (kollagének és fibronectin) termelődését.
 13. Proximális tubulus sejteken és a teljes vesében egyaránt kimutattuk, hogy a DAPA kezelés csökkenti a hiperglikémia indukált *O*-GlcNAcilációt, elsősorban a szintézisért felelős enzim, az OGT –gátlásán keresztül.
 14. Bizonyítottuk, hogy a hiperglikémiával párhuzamosan jelenlévő hipoxia miatt indukálódó profibrotikus faktorokat a DAPA kezelés csökkenti, így másik útvonalon, az oxigénhiány okozta károsodás mérséklésével is hozzájárul a fibrózis megelőzéséhez és a vesefunkció javításához.
 15. Megállapítottuk, hogy a DAPA monoterápiában ugyanolyan hatékony az *in vivo* és *in vitro* kísérletekben, mint a non-depresszor dózisú losartánnal történő kombinált kezelésben.
 16. Elsőként írtuk le a S1R expressziós mintázatát különböző nefronszegegmentekben. A receptor legnagyobb mennyiségben a kortexben, kisebb mennyiségben a medullában és a papillában is megtalálható.
 17. Először bizonyítottuk a S1R agonisták antifibrotikus hatását a vesében. Kimutattuk, hogy a FLU dóziszfüggő módon, hatékonyan csökkenti a DKD-ban jelentkező vesefunkció romlást, mérsékli a mikroalbuminúriát, és az ECM felszaporodást.
 18. Leírtuk, hogy nem csak a FLU, de más, specifikusabb S1R agonisták (SA4503, PRE-084) is közvetlenül gátolják a fibroblasztok proliferációját, illetve az ECM komponensek termelését. Az antagonistá NE100 felfüggesztette a javulást, ez alátámasztja a S1R mediált renoprotektív hatást.
 19. Kimutattuk, hogy az ösztrogén, a S1R perinukleáris régióból citoplazmába történő áthelyeződését indukálja. A transzlokáció következtében fokozódik a hősokk válasz fehérjéinek (HSF, HSP72, HSP27) termelődése. Nőstényekben a NKA működése, az enzim lokalizációja az iszkémiás inzultust követően megtartottabb, ami részben az aktívabb chaperon-hatásnak tulajdonítható.

20. Bizonyítottuk a FLU kezelés védő hatását a renális IRI-vel szemben. Új molekuláris útvonal, a S1R transzlokáción keresztül megvalósuló, Akt - NO mediált vazodilatáció szerepét igazoltuk a kedvezőbb posztiszkémiás túlélés és vesefunkció háttérében, ami felveti a S1R, mint új ígéretes gyógyszer célpont relevanciáját az akut vesekárosodás terápiájában.
21. Leírtuk, hogy a S1R agonista kezelés javítja a beültetett vese rövid, és középtávú működését, csökkenti a műtét következtében létrejövő oxigénhiány okozta szöveti károsodást, elősegítve ezzel a vesetranszplantáció sikerét.

VI. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, A PHD ÉRTEKEZÉST KÖVETŐEN MEGJELENT ELSŐ - VAGY UTOLSÓSZERZŐS KÖZLEMÉNYEK

Angol nyelvű:

1. Balogh DB, Molnar A, Hosszu A, Lakat T, Hodrea J, Szabo AJ, Lenart L, **Fekete A**. Antidepressant effect in diabetes-associated depression: A novel potential of RAAS inhibition. Psychoneuroendocrinology. 2020 Aug;118:104705. **IF: 4,732**
2. Hodrea J, Balogh DB, Hosszu A, Lenart L, Besztercei B, Koszegi S, Sparding N, Genovese F, Wagner LJ, Szabo AJ, **Fekete A**. Reduced O-GlcNAcylation and tubular hypoxia contribute to the antifibrotic effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin in the diabetic kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2020 Apr 1;318(4):F1017-F1029. **IF: 3,114**
3. Lenart L, Balogh DB, Lenart N, Barczy A, Hosszu A, Farkas T, Hodrea J, Szabo AJ, Szigeti K, Denes A, **Fekete A**. Novel therapeutic potential of AT1R blockade in a rat model of diabetes-associated depression parallels altered BDNF signalling. Diabetologia. 2019 Aug;62(8):1501-1513. **IF: 7,518**
4. Koszegi S, Molnar A, Lenart L, Hodrea J, Balogh DB, Lakat T, Szkibinszkij E, Hosszu A, Sparding N, Genovese F, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, **Fekete A**. RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition. J Physiol. 2019 Jan;597(1):193-209. **IF: 4,984**
5. Hosszu A, Antal Z, Veres-Szekely A, Lenart L, Balogh DB, Szkibinszkij E, Illesy L, Hodrea J, Banki NF, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, **Fekete A**. The role of Sigma-1 receptor in sex-specific heat shock response in an experimental rat model of renal ischaemia/reperfusion injury. Transpl Int. 2018 Nov;31(11):1268-1278. **IF: 3,526**
6. Nemcsik J, László A, Lénárt L, Eörsi D, Torzsa P, Körösi B, Cseprekál O, Tislér A, Tabák Á, Gonda X, Rihmer Z, Hodrea J, Nemcsik-Bencze Z, **Fekete A**. Hyperthymic affective temperament and hypertension are independent determinants of serum brain-derived neurotrophic factor level. Ann Gen Psychiatry. 2016 Jul 29;15:17. **IF:1,785**
7. Hosszu A, Antal Z, Lenart L, Hodrea J, Koszegi S, Balogh DB, Banki NF, Wagner L, Denes A, Hamar P, Degrell P, Vannay A, Szabo AJ, **Fekete A**. σ 1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Soc Nephrol. 2017 Jan;28(1):152-165. **IF: 8,655**
8. Gellai R, Hodrea J, Lenart L, Hosszu A, Koszegi S, Balogh D, Ver A, Banki NF, Fulop N, Molnar A, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, **Fekete A**. Role of O-linked N-acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Dec 1;311(6):F1172-F1181. **IF: 3,611**
9. Lenart L, Hodrea J, Hosszu A, Koszegi S, Zelena D, Balogh D, Szkibinszkij E, Veres-Szekely A, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, **Fekete A**. The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. Psychopharmacology (Berl). 2016 Apr;233(7):1269-78. **IF: 3,308**
10. Banki NF, Ver A, Wagner LJ, Vannay A, Degrell P, Prokai A, Gellai R, Lenart L, Szakal DN, Kenesei E, Rosta K, Reusz G, Szabo AJ, Tulassay T, Baylis C, **Fekete A**. Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against STZ-induced diabetic nephropathy in rats. PLoS One. 2012;7(6):e39938. **IF: 3,730**

11. **Fekete A**, Rosta K, Wagner L, Prokai A, Degrell P, Ruzicska E, Vegh E, Toth M, Ronai K, Rusai K, Somogyi A, Tulassay T, Szabo AJ, Ver A. Na⁺/K⁺-ATPase is modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney-another reason for diabetic nephropathy? J Physiol. 2008 Nov ;586(22):5337-48. IF: 4,650

Magyar nyelvű:

12. Hodrea J, Balogh DB, Lénárt L, Kőszegi S, Hosszú Á, Vannay Á, Wagner JL, Reusz Gy, Szabó AJ, **Fekete A**. A nátrium-glükóz-kotranszporterek szerepe a diabeteses nephropathiában. Hypertonia Nephrol 2015 19(4):153-158.

13. **Fekete A**, Vannay Á. A diabeteses nephropathia jelentősége gyermekkorban. Klinikum és alap kutatás az elmúlt évtizedekben Importance of diabetic nephropathy in childhood. Clinical findings and basic research in recent decades. Orv Hetil. 2014 Jan 26;155(4):141-50.

14. Hodrea J, Lenart L, Gellai R, Koszegi S, Wagner LJ, Banki NF, Ver A, Vannay A, Tulassay T, **Fekete A**. A diabeteshez társuló depresszió patomechanizmusa. Belorv Arch. 2013;(4):198-203.

15. Bánki NF, Kőszegi S, Wagner L, Lénárt L, Varga D, Gellai R, Hodrea J, Vér Á, Szabó AJ, Tulassay T, Fekete A. Új terápiás támpontok a diabéteszes nephropathia kezelésében: a renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszer és a Na/K ATP-áz szerepe. Gyermekgyógyászat 2013;64:70-73.

15. **Fekete, Andrea** ; Rusai, Krisztina ; Müller, Veronika ; Prókai, Ágnes ; Vannay, Ádám ; Vér, Ágota ; Bánki, Nóra ; Gál, Krisztina ; Tulassay, Tivadar ; Reusz, György; Szabó AJ. Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás patomechanizmusának experimentális vizsgálata Gyermekgyógyászat 2009;(60):1; 14-20.

16. **Fekete A**, Vannay, Á, Tulassay T, Végh E, Szabó AJ, Vér Á. Nemi különbségek az ischaemia-reperfúziós károsodás okozta akut veseelégtelenségben: a Na/K-ATPáz szerepe. Hypertonia Nephrologia 2005;(1); 53-54.

KÖNYVFEJEZETEK:

14. Hosszu A, Kaucsar T; Seeliger E, **Fekete A**. Animal Models of Renal Pathophysiology and Disease, In: Pohlmann, Andreas (szerk.) Preclinical MRI of the Kidney: Methods and Protocols, New York (NY), Amerikai Egyesült Államok: Springer US, (2021) pp. in-press.

15. Hosszu A, Kaucsar T; Seeliger E, Reimann HM, **Fekete A**. Preparation and Monitoring of Small Animals in Renal MRI In: Pohlmann, Andreas (szerk.) Preclinical MRI of the Kidney: Methods and Protocols, New York (NY), Amerikai Egyesült Államok: Springer US, (2021) pp. in-press.

16. **Fekete A**, Szabó AJ, Banki NF, Györffy B, Vásárhelyi B, Tulassay T. Chapter VIII- Pooling Analysis of Genetic Data: Heat Shock Protein HSPA1B (1267) G Allele: A Possible Selection Factor for Civilization Diseases?! In: E, Morel; C, Vincent (szerk.) Heat shock proteins : New Research New York (NY), Amerikai Egyesült Államok : Nova Science Pub, (2008) pp. 153-163, Scopus

17. Szabó AJ, Fekete A. Kísérletes transzplantáció, In: Perner, Ferenc; Petrányi, Győző (szerk.) Szervátültetés, Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt.,(2013) pp. 455-463.

SZABADALMAK

14. **Fekete A**, Vannay Á. Use of Sigma-1 receptor compounds US-2016346290-A1 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US2016346290>

15. **Fekete A**, Hosszú Á, Vannay Á. Composition for organ preservation WO2018096376 <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail>

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

dc_1685_19

Először szeretnék köszönetet mondani családomnak, *szüleimnek*, férjemnek, *Wagner Lászlónak*, fiaimnak *Mikinek*, *Andrisnak*, *Áronnak*. Mindenért. Szeretetek és türelmetek nélkül nem ment volna.

A szakmai életemben mindenekelőtt kiemelt köszönettel tartozom *Vér Ágota* tanárnőnek, *Friedhelm Hildebrandt*, *Pálinkás József* és *Mandl József* professzor uraknak, akik sokszor már azelőtt hittek bennem, mielőtt én elhittem...

Külön köszönet illeti *Szabó Attila* professzor urat, akit örök főnökömnek tekintek, első TDK hallgatójaként, majd doktoranduszaként bevezetett a tudományos gondolkodásba, és éveken át irányt mutatott. Köszönöm, hogy hosszú ideje függetlenséget ad, bízik bennem és számíthatok rá.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, akik közül többen az évek alatt barátságukkal is megtiszteltek, hogy végtelen lendülettel, kitartóan dolgoznak, számtalanszor újrakezdve. A „senioroknak” *Bánki Fanni*, *Balogh Dóra*, *Hodrea Judit*, *Hosszú Ádám*, *Lénárt Lilla* köszönöm az alázatot, ahogy a tudományos kérdésekhez álltok, a példamutató elkötelezettséget, ahogy kutatócsoportunk fiataljaival foglalkoztok, a sok vidámságot és néha vigasztalást. Minden eredményem közül Rátok vagyok a legbüszkébb.

Köszönettel tartozom a lehetőségért *Várkonyi Attilának*, *Lantos Csabának* és *Duda Ernőnek*. Általuk egy új szemléletmódot ismertem meg, tapasztalt biotech befektetőkként szabad kezét adva álltak a szabadalmaink mögé, bizalmuk nagyon motiváló.

Köszönöm *Tulassay Tivadar* professzor úrnak, hogy majd két évtizede a Klinikára hívott egy nemzetközi szintű szakmai műhelybe. Konzervatív eleganciája, reneszánsz műveltsége máig lenyűgöz.

Köszönöm *Vannay Ádámnak* az elmúlt húsz év közös munkáját, kísérleteit, erőfeszítéseit, nélküle sok eredmény nem született volna meg.

Köszönöm régi, *Gellai Renáta*, *Károly Éva*, *Kőszegi Sándor*, *Molnár Ágnes*, *Rosta Klára*, *Szkibinszkij Edgár* és jelenlegi tanítványaimnak, *Lakat Tamás* (külön köszönöm az értekezés ábráit), *Minh Tran*, *Tóth Ákos* az érdeklődést, szorgalmat, hogy hétvégén sem probléma egy kísérlet befejezése. Jó, hogy ilyen fiatalokkal dolgozhatok együtt.

Köszönöm azoknak a szakmai kiválóságoknak, akikkel együttműködtünk, az inspiráló gondolkozást és önzetlen segítséget. *Dénes Ádám*, *Mikics Éva*, *Órfi László*, *Kovács Illés*, *Chris Baylis*, *Jenny Sasser*, *Reusz György*, *Szigeti Krisztián*, *Hamar Péter*, *Nemcsik János*, *Sebestyén Anna*, *Degrell Péter*, *Vásárhelyi Barna*, *Chris Wilcox*, *Heymut Omran* sokat tanultam, tanulok tőlük.

Vannak olyanok is, akikkel nincs szoros szakmai kapcsolatunk, de egyfajta módon példaképek; figyelni őket, beszélgetni velük sokat jelent: *Szabó Miklós*, *Veres Gábor*, *Nusser Zoltán*, *Kovács Mihály*, az ETT-TUKEB szakmai kollégiumának tagjai, köszönöm.

Köszönettel tartozom a *Lendület Programnak* és az MTA-ban a programot támogató munkatársaknak, a *Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinikáján*, a *freiburgi Albert Ludwigs Universitat Gyermekklinikáján* és a *University of Gainesville Élettani Intézetében* dolgozó kollégáknak, hogy támogató légkörben végezhettem tudományos munkámat.

Köszönöm a *Semmelweis Egyetem* és *MTA Nephrológiai Kutatócsoport* korábbi és jelenlegi tagjainak, kiemelve *Bernáth Máriát*, hogy húsz éve egy segítő, baráti közeg részese lehetek.

Végül köszönöm a kutatások anyagi háttérét adó szervezeteknek: *MTA-Lendület Program*, *NKFIH*, *OTKA*, *ETT*, *Magyary és Bolyai Ösztöndíjak*, *Semmelweis Egyetem*, *Zsigmond Diabetes alapítvány*, *Magyar Nefrológus Társaság*, *Pfizer Foundation*, *Richter Gedeon Zrt.*