Akadémiai Doktori Értekezés

ÚJ MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSOK ÉS TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK A DIABÉTESZHEZ TÁRSULÓ SOKSZERVI SZÖVŐDMÉNYEK KEZELÉSÉBEN

Fekete Andrea

2020



TARTALOMJEGYZÉK	
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	7
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	9
TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK JEGYZÉKE	13
I. ELŐZMÉNYEK ÉS IRÁNYVONALAK	16
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	17
II.1. DIABÉTESZ MELLITUSZ	17
II.1.1. A DM epidemiológiája	17
II.1.2. A DM etiológiája, klasszifikációja, diagnózisa	18
II.1.3. A DM szövődményei	20
II.2. DIABÉTESZ ÉS DEPRESSZIÓ	20
II.2.1. Depresszió epidemiológiája	20
II.2.2. A depresszió tünetei, diagnózisa	21
II.2.3. A DM és depresszió közötti kapcsolat - áttekintés	22
II.2.3.1. Neuroinflammációs hipotézis	23
II.2.3.2. Hipoperfúziós hipotézis - renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	24
II.2.3.3. Neuroendokrin hipotézis	26
II.2.3.4. Neurotrófikus hipotézis	26
II.2.4. A Sigma-1 receptor	28
II.3. Diabéteszes vesekárosodás	31
II.3.1. A DKD epidemiológiája	31
II.3.2. A DKD tünetei, diagnózisa	31
II.3.3. A DKD patogenezise	34
II.3.3.1. A DKD és RAAS aktiváció	36
II.3.3.2. A DKD és O-GlcNAciláció	
II.3.3.3. A DKD és hipoxia	
II.3.4. A DKD és fibrózis	40
II.3.5. A DKD kezelése	
II.3.5.1 Új szerek kísérleti fázisban a DKD terápiájában	43
II.4. VESETRANSZPLANTÁCIÓ	44
II.4.1. Az iszkémia/reperfűziós károsodás	46
II.4.2. Az IRI patofiziológiája	46
II.4.3. Citoprotektív mechanizmusok az IRI-vel szemben	

dc_1685_19 III. CÉLKITŰZÉSEK	51
IV. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS MÓDSZEREK	52
IV.1. IN VITRO MODELLEK	
IV.1.1. Sejttenyésztés	
IV.1.2. Hiperglikémia in vitro modellezése	53
IV.1.3. Fibrózis in vitro indukciója	53
IV.1.4. Hipoxia in vitro indukciója	53
IV.1.5.Oxidatív stressz in vitro indukciója	54
IV.2. IN VIVO MODELLEK	54
IV.2.1. Kísérleti állatok	54
IV.2.2. Streptozotocin-indukált diabétesz modell	54
IV.2.3. Vese IRI patkánymodell	58
IV.2.4. Vese izograft autotranszplantációs patkánymodell	60
IV.2.5. Vese hideg iszkémiás patkánymodell	60
IV.3. In vivo funkcionális vizsgálatok	61
IV.3.1. Képalkotó vizsgálatok	61
IV.3.1.1. Két-foton mikroszkópos mérések	61
IV.3.1.2. SPECT- MRI	62
IV.3.2. Vérnyomás- és pulzusmérés	
IV.3.3. Viselkedési tesztek	63
IV.3.3.1. Erőltetett úszás teszt	63
IV.3.3.2. Porond teszt	64
IV.4. Szérumból, vizeletből laboratóriumi végzett mérések	65
IV.4.1. Fotometriás mérések	65
IV.4.2. ELISA mérések	65
IV.5. Hisztológiai vizsgálatok	66
IV.5.1. Hematoiylin-eozin festés	66
IV.5.2. Perjódsav-Schiff festés	66
IV.5.3. Masson-féle trichrome festés	67
IV.5.4. Sirius-red festés	67
IV.6. Immunhisztokémia	67
IV.6.1. Agy immunhisztokémiai festés	67
IV.6.2. Vese immunhisztokémiai festés	68
IV.6.3. TUNEL próba	69
IV.7. Molekuláris biológiai módszerek	69

IV.7.1. RNS izolálás és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció
IV.7.2. Géncsendesítés
IV.7.3. WESTERN BLOT
IV.8. STATISZTIKAI KIÉRTÉKELÉS
V. EREDMÉNYEK
V.1. DIABÉTESZ ÉS DEPRESSZIÓ
V.1.1. SIR agonista fluvoxamin (FLU) kezelés TIDM asszociált depresszió állatmodelljében 7
V.1.1.1. A FLU kezelés hatása a metabolikus és neuroendokrin paraméterek változására7
V.1.1.2. A FLU mérsékli a DM-indukált depresszió-szerű viselkedést T1DM állatmodellbe
V.1.1.3. A FLU aktiválja a S1R-BDNF jelátviteli tengelyt
V.1.2. A RAASi kezelés T1DM indukálta depresszióban
V.1.2.1. A LOZ csökkenti a diabéteszes állatok depressziószerű viselkedését
V.1.2.2. A cukorbeteg állatok csökkent agyi perfúzióját a LOZ nem befolyásolja
V.1.2.3. A T1DM-ben aktiválódó neuroinflammációs folyamatokat a LOZ csökkenti8
V.1.2.4. A LOZ fokozza a BDNF szintézisét
V.1.2.5. A LOZ hatása a hippokampális BDNF jelátiviteli útvonalra
V.1.3. Egyéb RAASi kezelések neuroprotektív hatása T1DM indukált depresszióban
V.1.3.1. RAASi-k enyhítik a DM okozta depressziószerű tüneteket
V.1.3.2. Az AT1 és AT2 receptorok kifejeződése a diabéteszes patkányok agyában
V.1.3.3. A RAASi-k az agyi vérátáramlást nem változtatják, de csökkentik a
neuroinflammációt
V.1.3.4. A hippokampális BDNF szintet a RAASi kezelések növelik és aktiválják a TrkB
jelátviteli útvonalat
V.2. A DKD kezelésének új lehetőségei
V.2.1. RAASi kezelés renoprotektív, antifibrotikus hatása DKD állatmodelljéban
V.2.1.1. A RAASi-k hatása a metabolitikus paraméterekre DKD állatmodellben
V.2.1.2. A RAASi kezelés mérséklik a veseműködés beszűkülését DKD-ban
V.2.1.3. RAASi kezelések mérsékelték a vese szövettani károsodását DKD-ban
V.2.1.4. A RAASi kezelés csökkentik fibrózis indukált növekedési faktorok szintjét DKD-
ban
V.2.2. A hiperglikémia és a RAASi kezelés in vitro hatása a profibrotikus folyamatokra9
V.2.2.1. RAASi-k hatása a RAAS elemek expressziójára hiperglikémiás HK-2 és NRK-49 seitekben
V.2.2.2. RAASi-k hatása a RAAS elemek expressziójára HK-2 és NRK-49 sejtekben9

V.2.2.3. RAASi kezelések hatása a profibrotikus faktorok indukálta morfológiai változásra
94
V.2.2.4. RAASi-k hatása a profibrotikus faktor-indukált sejtproliferációra95
V.2.2.5. A RAASi kezelés mérsékli a PDGF és CTGF/CCN2 indukálta αSMA termelést96
V.2.3. RAASi kezelés és az O-GlcNAciláció, mint lehetséges patomechanizmus
V.2.3.1. A hiperglikémia hatása a proximális tubulus fehérjék O-GlcNAcilációjára és az
enzimek mennyiségére
V.2.3.2. A hiperglikémia hatása a proximális tubulus Akt-eNOS-NKA-HSP72 útvonalra98
V.2.3.3. A RAASi kezelés hatása az O-GlcNAcilációra és az enzimek mennyiségére DKD-
ban99
V.2.3.4. Az Akt-eNOS-NKA-HSP72 útvonal változása RAASi kezelést követően DKD-ban
V.2.4. Az SGLT2i DAPA kezelés renoprotektív hatásának vizsgálata DKD-ban104
V.2.4.1. A DAPA kezelés mérsékeli a T1DM-ben kialakuló anyagcserezavart104
V.2.4.2. A DAPA kezelés mérsékeli a vesefunkció beszűkülését DKD-ban105
V.2.4.3. A DAPA kezelés mérsékeli a fibrotikus folyamatokat a vesében106
V.2.4.4. A DAPA csökkenti a fehérjék O-GlcNAcilációját a vesében és HK-2 proximális
tubulus sejteken107
V.2.4.5. A DAPA hatása a proximális tubulus sejtek hipoxiás károsodására109
V.2.5. SIR agonista fluvoxamin kezelés, mint a DKD új terápiás lehetősége110
V.2.5.1. A S1R jelen van a vesében110
V.2.5.2. A FLU kezelés javítja a vesefunkciót DKD-ban111
V.2.5.3. A FLU kezelés mérsékli a mezangiális mátrix expanziót DKD-ban112
V.2.5.4. A FLU kezelés csökkentette a renális fibrózist DKD-ban113
V.2.5.5. A S1R agonista kezelés csökkenti a renális fibroblasztok proliferációját114
V.3. ÚJ STRATÉGIÁK A VESETRANSZPLANTÁCIÓ KIMENETELÉNEK JAVÍTÁSÁRA115
V.3.1. Nemi különbségek a S1R változásában IRI során115
V.3.1.1. Az ösztrogén szerepe a S1R mediált hősokkválasz kialakításában in vitro115
V.3.1.2. Az ösztrogén szerepe a S1R mediált hősokkválasz kialakításában IRI indukált AKI-
ban116
V.3.1.3. Nemi különbségek a S1R, pAkt, HSF-1, HSP72, HSP27 és NKA fehérjeszintekben
V.3.2. SIR agonisták lehetséges protektív hatásai IRI okozta AKI kárososodás csökkentésében
V.3.2.1. Az endogén S1R agonista DHEA hatása a renális IRI –t követően119

V.3.2.2. A FLU renoprotektív hatású renális IRI-t követően120
V.3.2.3. A FLU mérsékli az IRI indukálta szisztémás gyulladást121
V.3.2.4. A FLU csökkenti a vese posztiszkémiás szöveti sérülését121
V.3.2.5. A FLU S1R-mediált NO termelődést okoz a proximális tubulus sejtekben122
V.3.2.6. A FLU a S1R –NO mediált vazodilatációval javítja a renális perfúziót IRI -ben124
V.3.3. SIR agonisták alkalmazása vesetranszplantáció során125
V.3.3.1. A S1R agonista tartalmú prezervációs folyadékban történő tárolás csökkenti a a
tárolás alatt elszenvedett hideg iszkémiás károsodást125
V.3.3.2. A S1R agonista kezelés javítja a beültetett graft állapotát KTx során127
VI. MEGBESZÉLÉS129
VII. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK154
VIII. SUMMARY AND NOVEL FINDINGS157
IX. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, A PHD ÉRTEKEZÉST KÖVETŐEN
MEGJELENT ELSŐ - VAGY UTOLSÓSZERZŐS KÖZLEMÉNYEK160
X. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ÖSSZEGZÉSE163
XI. IRODALOMJEGYZÉK164

"...mégis kitartasz, bár mi sem acéloz, csak Akaratod int: "Kitartani"..." (Ruyard Kipling: Ha)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyon sok embernek tartozom hálával azért, hogy eddig eljutottam. Bár mindig igyekszem megfelelni írott és íratlan szabályoknak, most eltérek a tradicionális formai felépítéstől.

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

Köszönöm közeli barátaimnak, különösen *Somogyi Krisztinának*, hogy követik a pályámat, ugyanakkor ki is kapcsolnak belőle, támogató figyelmük, nevetésük sokat segít.

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 első doktoranduszaként bevezetett a tudományos gondolkodásba, és éveken át irányt mutatott. Köszönöm azt is, 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 "szenioroknak" *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, ahol a szakmaiság és a gazdasági hasznosíthatóság együtt számít és közösek a célok. Tapasztalt biotech befektetőkként szabad kezet adva álltak a szabadalmaink mögé, bizalmuk még jobban motivál, hogy klinikailag is fontos dolgot hozzak létre.

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 régebbi, *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 vagy este sem probléma egy kísérlet befejezése. Jó, hogy ilyen fiatalokkal dolgozhatok együtt.

Köszönöm azoknak a szakmai kiválóságoknak, akikkel egy-egy kísérletben együttműködtünk, az inspiráló gondolkozást és önzetlen segítséget. *Dénes Ádám, Mikics Éva* (KOKI), *Őrfi László* (SE Gyógyszerészi Kémiai Intézet), *Kovács Illés* (SE Szemészeti Klinika), *Szigeti Krisztián* (SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet), *Hamar Péter* (SE Élettani Intézet), *Nemcsik János* (SE Családorvosi Tanszék), *Reusz György* (SE I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika), *Sebestyén Anna* (SE Patológiai Intézet), *Chris Baylis* (University of Florida), *Jenny Sasser* (University of Georgia), *Degrell Péter* (PTE), *Vásárhelyi Barna* (SE Labormedicina Intézet), *Chris Wilcox* (University of Washington), *Heymut Omran* (Universitatsklinikum Freiburg) 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 Gaineswille 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 hátterét adó szervezeteknek: *MTA-Lendület Program, NKFIH, OTKA, ETT, Magyary és Bolyai Ösztöndíjak, Semmmelweis Egyetem, Zsigmond Diabetes alapítvány, Magyar Nefrológus Társaság, Pfizer Foundation, Richter Gedeon Zrt.*

Köszönöm!

Budapest, 2020. szeptember 22.

Fekete Andrea

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

(Amennyiben a magyar kifejezést az Orvosi Helyesírási Szótár tartalmazza vagy elterjedten használt, az angol feloldást nem tüntettem fel, ahol nincs magyar megfelelő, ott csak az angol verzió szerepel.) ACE: Angiotenzin II-konvertáló enzim (angiotensin converting enzyme) ACTH: Kortikotropin (adrenocorticotropic hormone) ADA: American Diabetes Association AGE: Előrehaladott glikációs végtermék (advanced glycation end-product) AKI: Akut vesekárosodás (acute kidney injury) Akt: Protein kináz B ANGI: Angiotenzin I ANGII: Angiotenzin II ARB: Angiotenzin II receptor blokkoló (angiotensin receptor blocker) ATP: Adenozin-trifoszfát ATR1: 1-es típusú angiotenzin receptor ATR2: 2-es típusú angiotenzin receptor Bax: Bcl2-associated X protein Bcl-2: B-cell lymphoma 2 BDNF: Brain-derived neurotrophic factor BMP: Bone morphogenetic protein BNP: B-típusú natriuretikus peptid BSA: Borjú szérum albumin (bovine serum albumine) CaMK: Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase cDNS: Komplementer DNS CIT: Hideg iszkémiás idő (cold ischemic time) CREB: cAMP response element-binding protein CRH: Kortikotropin-serkentő hormon (corticotropin-releasing hormone) CTGF: Kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor) DAG: Diacil-glicerol DAPA: Dapagliflozin DGF: Megkésett graft funkció (delayed graft function) DHEA: Dehidroepiandroszteron DKD: Diabéteszes vesebetegség (diabetic kidney disease) DM: Diabétesz mellitusz DMEM: Dulbeco's Modified Eagle Medium ECM: Extracelluláris mátrix (extracellular matrix) EGFR: Epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor) EGTA: Etilén-glikol-tetraecetsav EMT: Epitéliális-mezenhimális tranzíció (epithelial mesenchymal transition) ENA: Enalapril EndoMT: Endotéliális-mezenhimális tranzíció (endothelial mesenchymal transition)

eNOS: Endoteliális nitrogén-monoxid szintáz

EPL: Eplerenon

ER: Endoplazmatikus retikulum

ERK: Extracelluláris szignál-szabályozott kináz (extracellular signal regulated kinase)

ESRD: Végstádiumú veseelégtelenség (end-stage renal disease)

FBS: Foetal bovine serum

FDA: Federal Drug Administration

FLU: Fluvoxamin-maleát

FN: Fibronektin

FST: Erőltetett úszásteszt (forced swim test)

Gab1: GRB2-associated-binding protein 1

GFR: Glomeruláris filtrációs ráta

GLUT: Glükóz transzporter

GOT: Glutamát-oxálacetát aminotranszferáz

GPT: Glutamát-piruvát transzamináz

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

HbA1c: Hemoglobin A1c (glikált hemoglobin)

HBP: Hexózamin bioszintézis útvonal (hexosamine biosynthesis pathway)

HDL: Magas denzitású lipoprotein (high density lipoprotein)

HK-2: Human kidney immortalised cell line

HLA: Human leukocita antigén

HPA: Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (hypothalamic-pituitary-adrenal)

HSF: Hősokk-faktor

HSP: Hősokk protein

IDF: International Diabetes Federation

IFG: Emelkedett éhomi vércukor (impaired fasting glucose)

IGT: Csökkent glükóztolerancia (impaired glucose tolerance)

IL: Interleukin

IP: Intraperitoneális

IRE1: Inositol requiring enzyme - 1

IRI: Iszkémia/reperfúziós károsodás (ischemia/reperfusion injury)

IRS1/2: Inzulin receptor szubsztrát 1/2 (Insulin receptor substrate 1/2)

JNK: c-Jun N-terminális kináz (c-Jun N-terminal kinase)

KIR: Központi idegrendszer

KVE: Krónikus veseelégtelenség

LAP: Latency-associated peptide

LOZ: Lozartán

MAP: Artériás középnyomás (mean arterial pressure)

MCP-1: Monocita kemoattraktáns protein-1 (monocyte chemoattractant protein 1)

MEK: Mitogén aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)

MMP: Mátrix metalloproteináz (matrix metalloproteinase)

MR: Mineralkortikoid-receptor

MRI: Mágneses rezonancia képalkotás mTOR: Mammalian target of rapamycin NE100: N,N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoxi)-fenil]-etilamin monohidroklorid NF-kB: Nukleáris faktor - kappa B (nuclear factor-kappaB) NKA: Na⁺/K⁺ ATPáz nNOS: Neuronális nitrogén-monoxid szintáz NO: Nitrogén-monoxid NOS: Nitrogén-monoxid szintáz NRK-49F: Normal rat kidney fibroblast immortalized cell line OFT: Nyílt porondteszt (open field test) OGTT: Orális glükóztolerancia-teszt OGA: O-GlcNAc-áz OGT: O-GlcNAc transzferáz O-GlcNAc: Oxigén-kapcsolt ß-N-glükózamin (O-linked N-acetylglucosamine) OVX: Ovariektómia p75Ntr: Neurotrophin receptor p75 PAI-1: Plazminogén aktivátor inhibitor - 1 PAS: Perjódsav-Schiff PBS: Foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline) PCNA: Proliferating cell nuclear antigen PDGF: Vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor) PFC: Prefrontális kortex PGDFR: PDGF receptor PI3K: Foszfoinozitid 3-kináz PKC: Protein kináz C PLC: Foszfolipáz C PMSF: Fenil-metánszulfonil-fluorid RAAS: Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldosterone system) RAASi: Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer gátlószerek Raf: Serine/threonine-specific protein kinases RAM: Ramipril Ras: Small GTPase proteins RIP2: Receptor interacting protein-2 Rn18s: 18s riboszómális RNS ROS: Reaktív oxigén vegyületek (reactive oxygen species) RT-PCR: Valós idejű reverz transzkripciós polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction) S1R: Sigma-1 receptor SDS: Nátrium-dodecil szulfát SGLT2: Na-glükóz kotranszporter -2 SGLT2i: Na-glükóz kotranszporter -2 gátlószerek SMAD: Sma and Mad related family SPI: Spironolakton

SSRI: Szelektív szerotonin visszavétel gátló (selective serotonin reuptake inhibitor)

STZ: Streptozotocin

T1DM: 1-es típusú diabétesz mellitusz

T2DM: 2-es típusú diabétesz mellitusz

TBS: Tris-pufferelt sóoldat (tris-buffered saline)

TGF-β: Transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta)

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases

TNF-α: Tumor nekrózis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

TRIS: Tris(hidroximetil)-aminometán

TrkB: Tropomiozin receptor kináz B (tropomyosin-receptor kinase B)

USA: Amerikai Egyesült Államok

VCAM-1: Vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (vascular cell adhesion molecule -1)

VEGF: Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

WHO: World Health Organization

dc_1685_19 TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK JEGYZÉKE

Ábrák

- 1. ábra A cukorbetegség prevalenciája világszerte
- 2. ábra Depressziós hangulatzavar életkorra standardizált prevalenciája világszerte
- 3. ábra Szisztémás és agyi lokális RAAS
- 4 ábra A BDNF szignalizációs útvonalai
- 5. ábra A S1R1 receptor transzmembrán szerkezete
- 6. ábra A cukorbetegség és depresszió közötti patofiziológiai összefüggések
- 7. ábra Az egészséges és a diabéteszes vese struktúrális jellemzői
- 8. ábra A DKD lefolyása
- 9. ábra Glükózfelvétel a vesében
- 10. ábra A DKD kialakulásának mechanizmusai
- 11. ábra Az O-GlcNAciláció folyamata
- 12. ábra A HIF-1α útvonal szabályozása a hipoxiás válaszra
- 13. A renális fibrózis részfolyamatai
- 14. ábra Szervdonációk száma Magyarországon (1997-2019)
- 15. ábra A peritubuláris kapillárisokban és a proximális tubulusban iszkémiás károsodásra bekövetkező változások
- 16. ábra Egészséges és streptozotocin indukált cukorbeteg patkány fenotípusos jellemzői
- 17. ábra A streptozotocin indukált diabéteszes állatmodellben alkalmazott protokollok
- 18. ábra Iszkémia/reperfúziós károsodás műtéti modelljének lépései és az alkalmazott protokollok
- 19. ábra Vesetranszplantáció műtéti modelljének lépései és az alkalmazott protokoll
- 20. ábra Két-foton mikroszkópos felvétel
- 21. ábra Erőltetett úszás teszt
- 22. ábra Porond teszt
- 23. ábra A S1R géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzése HK-2 sejtekben
- 24. ábra Az erőltetett úszás teszt és a porond teszt értékelése
- 25. ábra Bdnf és Sigmar1 mRNS illetve fehérjeszintek
- 26. ábra Erőltetett úszástesztet és porondteszt
- 27. ábra Artériás középnyomás vizsgálata és agyi véráramlás mérése T1DM asszociált depresszióbam
- 28. ábra A neuroinflammáció változása
- 29. ábra A DM indukált BDNF csökkenést és lokalizáció változást a LOZ normalizálja
- 30. ábra A LOZ hatása a mBDNF TrkB jelátviteli útvonalra
- 31. ábra Agtr1 és Agtr2 mRNS expresszió
- 32. ábra RAASi kezelések hatása az agyi perfúzióra és a neuroinflammációra
- 33. ábra proBDNF, mBDNF és átalakító enzimek illetve szignáltranszdukcióban résztvevő faktorok változása cukorbetegségben illetve RAASi kezelés hatására
- 34. ábra Vizelet uC3M, TUM és rPRO-C3 szintek
- 35. ábra Mezangiális mátrix kiterjedése
- 36. ábra Fibrotikus szövet felszaporodása
- 37. ábra Kollagén-dús szövet felszaporodása
- 38. ábra Fibronektin-dús szövet felszaporodása

- 39. ábra Profibrotikus faktorok és fibrózis markerek mRNS expressziójának változása
- 40. ábra α-SMA lokalizációja és mennyisége
- 41. ábra RAAS komponensek mRNS expressziója
- 42. ábra Profibrotikus faktorok mRNS expressziója
- 43. ábra Morfológiai változások kontroll, PDGFB és CTGF/CCN2 kezelt NRK-49F sejteken
- 44. ábra Pcna és Ki67 proliferációs markerek mRNS expressziója
- 45. ábra PDGFR-β lokalizáció és αSMA fehérjemennyiség változása fibroblasztokon
- 46. ábra Fehérjék O-GlcNAcilációja, OGT és OGA izoformák
- 47. ábra RAASi kezelés hatása az O-GlcNAcase hosszú izoformájának fehérje szintjére
- 48. ábra eNOS és Akt, illetve foszforilált formájuk fehérje szintjeinek változása
- 49. ábra Na⁺/K⁺ ATPáz és HSP72 fehérje mennyiségének változása
- 50. ábra Az O-GlcNAciláció, OGT és OGA izoformák fehérje mennyiségeinek változása
- 51. ábra eNOS és Akt, illetve foszforilált formájuk fehérje szintjeinek változása
- 52. ábra Na⁺/K⁺ ATPáz fehérje mennyiség és lokalizáció változása
- 53. ábra HSP72 fehérje mennyiség és lokalizáció változása
- 54. ábra HSP72 és Na⁺/K⁺ (NKA) kolokalizációja
- 55. ábra A DAPA kezelés lassítja a DKD kialakulását
- 57. ábra A DAPA kezelés csökkenti a kollagén és fibronektin felhalmozódást
- 58. ábra A DAPA kezelés csökkenti az O-GlcNAcilációt
- 59. ábra A DAPA kezelés csökkenti a hiperglikémia indukált O-GlcNAcilációt proximális tubulus sejteken
- 60. ábra A DAPA csökkenti a tubuláris hipoxiát
- 61. ábra A S1R receptor renális lokalizációja
- 62. ábra A FLU kezelés csökkenti a mezangiális mátrix expanzió kiterjedését
- 63. ábra A FLU csökkenti a vesefibrózist
- 64. ábra A S1R agonista hatóanyagok: fluvoxamin, SA-4503 és a PRE-084 gátolják a renális miofibroblasztok TGFß indukált extracelluláris mátrix termelődését és PDGFB indukált proliferációját
- 65. ábra A S1R és a hősokk válasz aktiválódása 17β-ösztradiol hatására
- 66. ábra Renális funkcionális és strukturális változások
- 67. ábra S1R-pAkt-HSP-NKA útvonal fehérjéinek változása
- 68. ábra A DHEA előkezelés protektív a renális iszkémia/reperfúziós károsodással szemben
- 69. ábra A FLU előkezelés protektív a renális iszkémia/reperfúziós károsodással szemben
- 70. ábra A FLU előkezelés csökkenti a vese struktúrális sérülését renális iszkémia/reperfúziós károsodást követően
- 71. ábra A S1R lokalizációjának és jelátviteli útjának változása oxidatív stressz illetve FLU hatására
- 72. ábra A FLU a S1R -NO mediált vazodilatáción keresztül javítja a renális perfúziót IRI kapcsán
- 73. ábra A S1R agonisták mérsékelik a hideg iszkémiás szöveti károsodást
- 74. ábra A S1R agonisták mérsékelik a hideg iszkémia okozta apoptózist
- 75. ábra Veseautotranszplantációt követően a S1R agonisták protektívek a renális funkionális, struktúrális és gyulladásos károsodásokkal szemben
- 76. ábra A RAASi feltételezett hatásmechanizmusa DM-hez társuló depresszióban

Táblázatok

- 1. táblázat T1DM és T2DM típusú cukorbetegség jellemzői
- 2. táblázat Hiperglikémiás in vitro modell kezelési csoportjai
- 3. táblázat Streptozotocin-indukált diabéteszes modellben alkalmazott kezelési csoportok
- 4. táblázat Immunhisztokémiai festéshez használt antitestek
- 5. táblázat PCR vizsgálatokhoz használt primerek
- 6. táblázat Western blot vizsgálatokhoz használt antitestek
- 7. táblázat. Metabolikus laborparaméterek
- 8. táblázat Neuroendokrin paraméterek
- 9. táblázat Porond teszt és erőltetett úszásteszt
- 10. táblázat: Metabolikus paraméterek változása
- 11. táblázat: Renális laborparaméterek
- 12. táblázat DAPA kezelés hatása a metabolikus paraméterekre
- 13. táblázat A FLU javítja a vesefunkciós paramétereket

dc_1685_19 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. 2008ban egy évet Prof. Chris Baylis laboratóriumában töltöttem, ahol a renális nitrogén-monoxid rendszer szerepét vizsgáltam a vesekárosodás kialakulásában. Az itt szerzett módszertani ismeretek meghatározóak voltak a renális perfúzió tanulmányozásához további itthoni kísérleteim során.

2011-ben Lendület ösztöndíjat nyertem, kutatásaim innentől a diabétesz (DM) okozta sokszervi szövődmények, elsősorban a vesekárosodás új 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 DM szövődményei határozzák meg a betegek életminőségét és várható élettartamát. A vesekárosodás a krónikus veseelégtelenség fő tényezője, a kardiovaszkuláris események a vezető halálokok között szerepelnek, a depresszió előfordulása az átlagpopuláció többszöröse. Napjainkban a szoros vércukor-kontroll jelenti a terápia alapját, de a szövődmények kezelés nem megoldott, a pszichés zavarok pedig sokszor diagnosztizálatlanok maradnak. A veseelégtelenség progressziója transzplantációt tehet szükségessé, ahol a graftműködés hosszútávú megőrzése elsődlegesen fontos.

Az értekezés tárgyalja a cukorbetegséghez társuló depresszió patomechanizmusát, különös tekintettel a Sigma-1 receptor és egyes neuroplaszticitásban fontos fehérjék változásaira. Részletesen vizsgálja a RAAS szerepét a depresszióhoz kapcsolódó neuroinflammációban, illetve bemutatja a RAAS gátlók antidepresszánsként történő alkalmazásának lehetőségeit. A dolgozat leírja a diabéteszes vesekárosodás funkcionális és strukúrális eltéréseit, középpontba állítva a renális fibrózis folyamatát, tanulmányozza több kezelési lehetőség: a RAAS gátlók, az SGLT inhibitor dapagliflozin, és a Sigma-1 receptor agonisták lehetséges renoprotektív hatásait. A kísérletek harmadik része a szerv transzplantáció során jelentkező, a beültetett későbbi funkcióját meghatározó iszkémia/repefúziós károsodás csökkentésének új lehetőségeit elemzi, elsősorban a prezervációs folyadék S1R agonistákkal történő kiegészítését.

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

dc_1685_19 II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. Diabétesz mellitusz

II.1.1. A DM epidemiológiája

A diabétesz mellitusz (DM) és társuló szövődményei napjaink kiemelkedő fontosságú népegészségügyi problémája, mely gazdasági és szociális szempontból jelentős terhet ró az euroatlanti társadalmakra. Az International Diabetes Federation (IDF) statisztikái szerint világszerte közel 463 millió cukorbeteg él, számuk 2045-re elérheti a 700 milliót (*1. ábra*) [1]. A globalizáció és a nyugati típusú életmód terjedése miatt a fejlődő országokban, Indiában, Kínában, Dél-Amerikában fokozott prevalencia-növekedés várható, a World Health Organization (WHO) akár 150%-os emelkedést jósol. Az összképet tovább rontja, hogy a becslések szerint további 200 millió a diagnosztizálatlan esetek száma [2].

Magyarországon nincs felnőtt regiszter, a legutolsó hazai keresztmetszeti vizsgálat alapján a felnőttek között a cukorbetegség előfordulása 7,75% [3]. Az IDF 2019-es felmérései szerint az arány 6,4%, de így is Európa magas incidenciájú régiói közé tartozunk [4]. A növekedés hátterében a populációk öregedésén kívül az elhízás és a metabolikus szindróma már-már járványszerű elterjedése áll, mely jelentősen növeli a szövődmények kialakulását is.



1. ábra A cukorbetegség prevalenciája világszerte a 20-79 éves korosztályban (Cho ábrája alapján módosítva) [1]

A DM magas mortalitású kórkép, a felnőtt lakosság halálozásának 11,3% -a kapcsolatba hozható a cukorbetegséggel. A magas halálozás hátterében elsősorban a fokozottabb kardiovaszkuláris mortalitás, szepszis, infekciók és tumorok gyakoribb előfordulása, illetve a renális szövődmények állnak.

A betegek ellátásának költsége a hosszan tartó kórlefolyás és a számtalan társbetegség miatt rendkívül magas. Magyarországon több, mint a GDP 0,65%-a, de az Amerikai Egyesült Államokban (USA) ennek akár a háromszorosa is lehet. Az elmúlt évben a kiadások összege világszinten meghaladta a 825 millárd (csak az USA-ban a 427 milliárd dollárt), mely az összes egészségügyi költség 13%-a [5]. A DM miatt bekövetkező korai halálozás, illetve a csökkent keresőképesség további negatív gazdasági következményekkel jár, melyet gyakran a cukorbetegség indirekt egészségügyi költségeiként definiálnak.

II.1.2. A DM etiológiája, klasszifikációja, diagnózisa

A cukorbetegség a szénhidrát anyagcsere krónikus zavara, melynek oka az inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya (1-es típus, T1DM), illetve a szervezet inzulinnal szembeni érzéketlensége (2-típus, T2DM). T1DM során a hasnyálmirigy β -sejtjeinek apoptózisa autoimmun folyamatok következménye, melynek pontos oka egyelőre tisztázatlan, de a genetikai prediszpozíció és környezeti faktorok szerepe feltételezhető [6]. A klinikai tünetek általában kisgyermek vagy adoleszcens korban kezdődnek, azonban az autoimmun folyamatok (és az autoantitestek megjelenése a keringésben) már jóval korábban elindulhat [7].

A T2DM jellemzően felnőttkorban (>40 év) manifesztálódik, legtöbbször az elhízás, illetve a metabolikus szindróma részjelenségeként. Az utóbbi évtizedekben a gyermekkori elhízással párhuzamosan, a gyermek és serdülő korosztályban is egyre nagyobb számban alakul ki inzulin-rezisztenciával társuló T2DM. Japánban és Tajvanban a 18 év alatti friss diabéteszesek már több mint fele; az USA-ban egyharmada T2DM-be tartozik [8]. A betegség hosszú távú prognózisa igen kedvezőtlen, a 10 éves kor előtt diagnosztizált esetekben a várható élettartam közel 20 évvel csökken, a halálozás a normál populáció négyszerese [9].

Bár a szénhidrát anyagcsere zavara T2DM-ben komplex folyamat, az elhízás következtében a megnövekedett viszcerális zsírszövet szerepe egyértelműnek látszik a β -sejt diszfunkció és az inzulinrezisztencia kialakulásában [10]. A genetikai háttér itt is meghatározó, a cukorbetegség az elsőfokú rokonok között szinte minden esetben előfordul. Mindezek mellett számos környezeti hatás, mint a dohányzás és a mozgásszegény életmód is önálló rizikófaktorként azonosítható. Az alábbi táblázat összefoglalja a két fő típus jellegzetességeit *(1. táblázat)*.

Szempontok	T1DM	T2DM
Oka	az inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya	az inzulinhatás elmaradása, inzulinrezisztencia
Életkor	bármikor, gyakrabban gyermek- vagy fiatal felnőttor	inkább felnőttkor (40. életévtől), de a korhatár csökken, gyermekkor is!
Gyakorisága	összes eset kb. 8-10%-a	az esetek kb. 90%-a
Testsúly	általában normális	normális vagy obezitás
Tünetek megjelenése	általában gyors, pár-hét hónap	lassú, atípusos
β-sejtek száma	kevesebb mint 10%	kezdetben normális, később csökken
Inzulin hiány	teljes	általában részleges, változó
Autoantitestek	igen	nem
Ketózis	kifejezett	nem jellemző
Inzulinterápia	szükséges	nem feltétlenül szükséges

1. táblázat T1DM és T2DM típusú cukorbetegség fő jellemzői

A két fő csoport mellett további kóroki tényező ismertek (gesztációs DM, neonatális DM, monogénes formák, stb.), melyek az értekezésben nem kerülnek részletes bemutatásra.

A cukorbetegség kórisméje T1DM-ben általában már a klasszikus klinikai tünetek (polidipszia, poliúria, egyéb okkal nem magyarázható jelentős fogyás) alapján igazolódik. T2DM esetében akár évtizedekig tünetmentesen alakulhat a betegség és gyakran csak szűrővizsgálat vagy egyéb kórállapot során végzett vércukor meghatározás eredményeként kerül felismerésre. A diagnózis felállításához a random vércukorérték (\geq 11,1 mmol/l), az éhomi vércukorszint (\geq 7,0 mmol/l), vagy az orális glükóztolerancia-teszt (OGTT) során mért kétórás érték (\geq 11,1 mmol/l) egyaránt alkalmas [11].

DM állapítható meg, ha (i) az éhomi (az utolsó energiafelvételt követően min. 10 órával a vércukor értéke vénás plazmában, enzimatikus módszerrel mérve eléri, vagy meghaladja a 7,0 mmol/l-t vagy (ii) random mért vércukorszint eléri, illetve meghaladja a 11,1 mmol/l értéket. Klasszikus tünetek hiányában (iii) az éhomi vércukorszint két különböző alkalommal mért értéke eléri vagy meghaladja a 7,0 mmol/l-t vagy (iv) OGTT kapcsán az éhomi vércukor eléri vagy meghaladja a 7,0 mmol/l-t és/vagy a 120 perces érték eléri vagy meghaladja a 11,1 mmol/l értéket (a kóros terhelési eredmény egy másik időpontban végzett méréssel megerősítendő).

A glikált hemoglobin (HbA1c) mérése alapján is lehetőség van a cukorbetegség diagnosztizálására. A HbA1c az utolsó 2-3 hónap vércukorértékeinek átlagát tükrözi, és 6,5% feletti érték esetén tekinthető kórosnak [12]. Az amerikai ajánlásokban a 6,5% fölötti HbA1c érték, mint önálló diagnosztikus paraméter is szerepel: HbA1c \geq 6,5% két mérés alkalmával vagy HbA1c \geq 6,5% és az éhomi plazma glükóz koncentráció (FPG) \geq 7 mmol/l [13].

Az egészséges szénhidrátanyagcsere és a DM közötti átmeneti állapot az emelkedett éhomi vércukorszint (IFG) és a csökkent glükóztolerancia (IGT). IFG akkor áll fenn, ha az éhomi vércukorszint 6,1 - 6,9 mmol/l és a két órás OGTT < 7,8 mmol/l. IGT igazolható, ha az OGTT két órás értéke 7,8 - 11 mmol/l és az éhomi vércukorszint értéke < 7 mmol/l [14]. A betegek folyamatos követése és ellenőrzése mindkét esetben indokolt, hiszen a krónikus hiperglikémia számos szerv funkciózavarát és strukturális károsodását eredményezheti [15].

II.1.3. A DM szövődményei

A cukorbetegség egyes típusainak patogenezise alapvetően különböző, mégis a szövődmények gyakoriságát és megjelenési formáit tekintve nagyon hasonlóak. A DM következtében akut és krónikus szövődmények jelentkezhetnek, a dolgozatban csak a krónikus eltérések kerülnek részletesebb ismertetésre.

A tartós hiperglikémia makro- és mikrovaszkuláris szövődmények kialakulásához vezet, melyek másodlagos sokszervi károsodást eredményeznek. Makroangiopátia során a nagyerek ateroszklerotikus elváltozásai fokozzák a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris károsodás kockázatát, rontják a kognitív funkciót és hangulatzavarokat okozhatnak. A mikroangiopátiás elváltozások nyomán diabéteszes vesekárosodás (DKD), neuropátia és szemészeti szövődmények alakulhatnak ki [16].

A DM társbetegségeként gyakran jelentkező depresszió tovább rontja a betegek életminőségét és együttműködését, az instabillá váló szénhidrát anyagcsere következtében jelentősen nő a mortalitás [17]. DKD esetén többszörösére emelkedik a kardiovaszkuláris szövődmények kockázata [18], ugyanakkor a szisztémás ateroszklerózis fokozza a vesekárosodás progresszióját. Míg a cukorbetegség önmagában 3-6-szoros, addig a DKD 15-20-szoros kardiovaszkuláris kockázattal jár az egészséges populációhoz viszonyítva. A továbbiakban a szövődmények közül a cukorbetegséghez társuló depresszió és vesekárosodás kerülnek részletesebb ismertetésre.

II.2. Diabétesz és depresszió

II.2.1. Depresszió epidemiológiája

A depresszió népbetegség: világszerte 320 millió embert érint, a nők között a negyedik, míg a férfiaknál a hetedik leggyakoribb kórkép (2.*ábra*). Földrajzi eloszlástól és életkortól függően a világ lakosságának 2-15%-a szorul az élete során legalább egy évig kezelésre depresszió miatt. A life-time prevalencia, vagyis a depressziós epizód előfordulása a teljes élet során jóval magasabb, egyes becslések szerint akár 40-50% is lehet [19]. A magyarországi adatok szerint a 44 évnél fiatalabbak

18%-a, a 45-64 évesek 31%-a, míg a 65 év felettiek 41%-a szenved depresszióra utaló tünetektől, ezzel hazánk első a régióban [20]. A gyakoriság azonban bizonyosan nagyobb, hiszen a betegek jelentős része panaszaival nem fordul orvoshoz vagy nem kap diagnózist és megfelelő kezelést.

Napjainkban a depresszió a munkaképesség-csökkenés második leggyakoribb oka, 2030-ra várhatóan a betegségteher legnagyobb részét képezi majd [8]. A depresszió gazdasági vonzata 21,5%-kal nőtt az USA-ban az elmúlt öt évben, a direkt egészségügyi kiadás költsége közel 100 milliárd dollár évente [21].



2. ábra Depressziós hangulatzavar életkorra standardizált prevalenciája világszerte (az ábra egészségügyi és epidemiológia kérdőíves felméréseken és metanalíziseken alapuló becslést mutat) [22]

II.2.2. A depresszió tünetei, diagnózisa

A depresszió magatartásbeli, szomatikus és vegetatív tünetegyüttesének diagnosztizálása a Diagnostic and Statistical Manual-IV (DSM-IV) kritériumrendszer, valamint az International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) protokollok alapján történik [23, 24]. Aszerint, hogy a tünetek közül mennyi van egyszerre jelen, enyhe, közepes és súlyos (major) depressziós epizódról beszélhetünk [25].

Major depresszió igazolható, ha az alábbi tünetek közül legalább öt minimum két hétig fennáll, és a negatív hangulati eltolódás vagy a csökkent érdeklődés mindenképpen jelen van: negatív hangulati eltolódás, érdeklődés elvesztése, jelentős súlyváltozás, alvászavar, motoros nyugtalanság

vagy gátoltság, fáradtság, értéktelenség vagy bűntudat érzése, beszűkült gondolkodás, szuicid szándék, terv vagy kísérlet [25]. A betegség szűrése a mindennapi gyakorlatban a Beck-, illetve Zungféle depresszió kérdőívvel vagy a Kórházi szorongás- és depresszióskálával történik [26-28].

A depresszióra jellemző tünetegyüttesek kialakításában számos agyi terület vesz részt. A hippokampusz és a prefrontális kortex (PFC) egyes kognitív tünetek, mint a memória zavar, a bűntudat és a reménytelenség érzés kialakításáért felelős. A striátum és az amigdala érintettsége okozza az anhedóniát és a csökkent motivációt, míg a hipotalamikus változások az étvágytalanság és az alvászavar megjelenéséhez vezetnek. Funkcionális mágneses rezonancia képalkotás (MRI) vizsgálatokkal igazolták, hogy depresszióban a PFC és a hippokampusz neuronális összeköttetései funkcionálisan és morfológiailag megváltoznak, ami a limbikus rendszer adott területein az emocionális, kognitív, illetve autonóm idegrendszer zavarait okozza [29]. Strukturális változások, mint a hippokampusz térfogatának csökkenése és a GABAerg neuronok számának változása korrelál a depresszió súlyosságával, illetve a betegség időtartamával [30, 31].

A DM-ben jelentkező depresszió gyakorisága, oka és patomechanizmusa kevéssé ismert. A jelenség multifaktoriális, amelyben a pszichoszociális tényezők szerepe egyértelmű, azonban egyre több kutatási eredmény utal arra, hogy a DM és komorbid depresszió kialakulásában közös molekuláris biológiai folyamatok is részt vesznek.

II.2.3. A DM és depresszió közötti kapcsolat - áttekintés

Meglepő, de a DM és depresszió közötti kapcsolatot felvető első gondolat már közel 400 éves. Thomas Willis neuroanatómus - amellett, hogy először azonosította a glükozúriát a cukorbetegség tüneteként, illetve leírta az agyban a circulus arteriousus Willisi-t - már 1686-ban feltételezte, hogy a cukorbetegség oka a "szomorúság és hosszan tartó bánat" [32]. Mindezek ellenére az ezt követő évszázadokban nem történt előrelépés az összefüggés tanulmányozásában. A vizsgálatok zöme epidemiológiai megfigyelésekre alapozva állapította meg, hogy a cukorbetegek között nagyobb a hangulatzavarok előfordulása, illetve depresszió esetén a DM gyakorisága emelkedik, azonban az esetek zömében továbbra is az életminőség romlását és a pszichoszociális tényezők szerepét valószínűsítették.

Az életmód jelentősége vitathatatlan mindkét betegség kialakulásában. Jól ismert, hogy a depresszióban szenvedők többet dohányoznak, több alkoholt fogyasztanak, egészségtelenül étkeznek, valamint fizikai aktivitásuk csökken. Ezek a tényezők mind a DM ismert, rizikófaktorai. Más vizsgálatok szerint azonban, a depresszió csak azokban az esetekben növeli a cukorbetegség kockázatát és rontja a glikémiás kontrollt, ha már eleve csökkent a glükóztolerancia [33].

Az ezredforduló környékén jelentek meg az első olyan tanulmányok, melyek statisztikai adatokkal is alátámasztották a két betegség gyakoribb együtt állását. Anderson és mtsai. 21 000 beteg keresztmetszeti vizsgálatával igazolta, hogy DM-ben kétszer gyakoribb a depresszió előfordulása kortól és nemtől függetlenül [34]. Kimutatták azt is, hogy a depresszió és az antidepresszánsok használata gyakrabban fordul elő a későbbiekben cukorbetegséggel diagnosztizált személyekben, azaz nem önmagában a DM, a betegségtudat vagy a kezeléssel kapcsolatos negatív életesemények növelik a depresszió kockázatát, hanem más patológiai tényezők is állhatnak a jelenség hátterében [35]. Egy tanulmány szerint a már fennálló depresszió esetén másfélszeres a cukorbetegség kialakulásának kockázata [36]. Továbbá kimutatták, hogy a depresszió jelenléte nemcsak a hiperglikémia és a DM előfordulását növeli, de fokozza számos szövődmény, mint a kardiovaszkuláris események, a neuro- és retinopátia, illetve a DKD gyakoriságát is [37].

Mindezek alapján egyértelmű a kétirányú kapcsolat, azonban továbbra sem tisztázott a komorbiditás mögött húzódó patomechanizmus. Napjaink kutatásai molekuláris szinten keresik a választ a két betegség biológiai kapcsolatára: hasonló gyulladásos folyamatok, oxidatív és nitrozatív stresszre adott válaszok, neuroendokrin, neurodegeneratív és vazoaktív folyamatok vizsgálatával, melyek teljes ismertetése a dolgozat kereteit meghaladja. Részletesebben csak a saját kutatásaink szempontjából jelentős közös neuroinflammációs, vazoaktív, és neurotróp változások kerülnek bemutatásra.

II.2.3.1. Neuroinflammációs hipotézis

A közelmúlt preklinikai és humán vizsgálatai alapján mára egyértelmű, hogy mind a cukorbetegséget, mind a depressziót krónikus, szubklinikus gyulladás jellemzi: a keringésben emelkedik a pro-inflammatorikus citokinek szintje, az agyban nő az aktiválódott immunsejtek száma. T1DM-ben egyrészt a pankreasz β -sejtjeinek elhalásával már a korai szakaszban nő az interleukin (IL)-1, IL-4, IL-6 és a tumor nekrózis faktor alfa (TNF- α) mennyisége [38, 39], melyet az inzulinhiány következtében kialakuló hiperglikémia tovább emel [40]. T2DM-ben elsősorban a felszaporodott viszcerális zsírszövetben, a nukleáris faktor kappa-B (NF- κ B) és a c-Jun N-terminális kináz (JNK) szignalizációs útvonalakon keresztül történik a pro-inflammatorikus kaszkád aktivációja, mely visszahatva hozzájárul az inzulin rezisztencia kialakulásához [41]. Megnő a keringő leukociták száma is, a monociták, limfociták és a neutrofilek aránya pozitív korrelációt mutat az inzulinrezisztenciával és a zsírszövet mennyiségével [42].

Hasonló folyamatokat látunk depresszióban is, a szisztémás keringésben emelkedik az IL-1, IL-6, TNF-α szintje [43]. Az irodalom álláspontja megosztott azt illetően, hogy akár az aktiválódott immunsejtek, akár a keringő citokinek átjutnak-e a vér-agy gáton. Egyes vizsgálatok szerint a pro-

inflammatorikus citokinek pl. a TNF-α megnövelik a vér-agy gát permeabilitását, és így az aktivált monociták bejutnak a központi idegrendszerbe (KIR) [44]. Más adatok azt mutatják, hogy ezek a sejtek még ha át is mennek a membránon nem jutnak be a parenchimába [45].

A közelmúlt állatkísérletes adatai alátámasztották, hogy a PFC és a hippokampusz területén aktiválódó mikroglia önmaga is képes citokin termelésre. A lokálisan felszaporodó gyulladásos mediátorok közvetlenül csökkentik a neuronok plaszticitását [46] és a depresszió jellegzetes tüneteit (kimerültség, étvágytalanság, alvászavar) idézik elő [47]. Ugyanakkor ezek a citokinek a vér-agy gáton keresztül kijutva a szisztémás keringésbe kerülve gyulladást okozhatnak, így hozzájárulnak a pankreasz β-sejteinek csökkent működéséhez, az inzulinrezisztencia és a T2DM kialakulásához/progressziójához [48]. Tehát a kétirányú hatás molekuláris szinten is tetten érhető.

II.2.3.2. Hipoperfúziós hipotézis - renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

Az agyi perfúziót a szisztémás hemodinamikai hatások és a cerebrovaszkuláris autoreguláció határozza meg. Az agyi erek állapota az artériás vérnyomás függvényében változik, a két rendszer komplex összehangoltsága biztosítja a KIR stabil perfúzióját. Preklinikai kísérletekben, illetve depresszióban szenvedő betegekben igazolták, hogy a laterális és mediális PFC és a hippokampusz fokozottan érzékenyek az autoregulációs zavarokra, ami magyarázza, hogy már a terület enyhe fokú hipoperfúziója is depresszióra jellemző klinikai tüneteket okozhat [49]. A kardiovaszkuláris rendszert érintő betegségekben, köztük DM-ben is, az aktiválódott renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) és a fokozott ateroszklerózis következtében a csökkenő érfal rugalmasság és endotél diszfunkció miatt az agyban lokális hipoperfúzió és vazokonstrikció alakul ki [50, 51].

A "klasszikus" RAAS-ban, a vesében termelődő renin a hepatocitákból származó angiotenzinogént hasítja és angiotenzin I (ANGI) keletkezik. A tüdő endotél, illetve a renális epitél sejtekben kifejeződő angiotenzin II konvertáló enzim-1 (ACE1) által bioaktív ANGII képződik [52], melynek elsődleges receptorai az angiotenzin receptor (ATR) 1 és az ATR2. Az ANG II alternatív - ACE független - úton is kialakulhat kimázok, kaboxipeptidáz, katepszin G vagy tonin enzimatikus aktivitása révén [53]. Az ACE másik izoformája, az ACE2 ANGI-ből ANG (1-9)-et, illetve ANGII-ből ANG (1-7)-et hasít [54], melyek részben az ATR2 és Mas receptoron keresztül hatnak *(3. ábra)*.

Egyre nyilvánvalóbb, hogy a RAAS működése komplexebb, mint feltételezték, a vérnyomás és a só- és vízháztartás szabályozása mellett számos más hatásért felelős. Az ANGII az ATR1-en keresztül vazokonstrikciót, gyulladást és fibrózist indukál [55], emellett fokozza a vazopresszin, az adrenokortikotróp releasing hormon és az aldoszteron szekrécióját. Az ATR2 és a Mas funkciója kevésbé tisztázott, egyes vizsgálatok szerint az ATR1 aktivációjával ellentétes hatású, vagyis leginkább anti-proliferatív, vazodilatatív és gyulladáscsökkentő folyamatokat közvetít [56].

A RAAS elemei a szisztémás keringésből a KIR-be a harmadik és negyedik agykamra körüli cirkumventrikuláris szervek fenesztrált kapillárisain keresztül kerülhetnek be, mert a vér-agy gáton nem jutnak át. Ugyanakkor bizonyított, hogy az agyban lokálisan is működik a klasszikus RAAS elemeit termelő agyi RAAS [57, 58]. Az agyi RAAS a vérnyomás, testhőmérséklet és lokomotoros aktivitás szabályozása mellett részt vesz a memória, a viselkedés és a tanulás folyamatában. Vazomotor hatásán kívül az ANGII neurohormonális és transzmitter funkciókat is ellát, indukálja a katekolaminok és az aldoszteron szintézisét, stresszhatásra fokozza a hipotalamusz-hipofízismellékvese (HPA) tengely aktivitását, mely központi szerepet játszik a vazoregulációban.

Az agyban a renint és az angiotenzinogént főleg a hipotalamikus és hipofízeális asztrociták, illetve a gliasejtek és neuronok termelik. Az enzimek mennyisége jóval kisebb, mint a szisztémás rendszerben, és aktivitásuk az életkorral csökken [59-61]. Az ANGII a hipotalamusz, hipofízis, kortex, amigdala, cerebellum és a hippokampusz területén szintetizálódik [62]. A klasszikus RAAS elemek mellett, az ACE2, ANG (1-7), ANG IV, ATR4 és Mas-receptor is kifejeződik az agyban [63], melyek működése két fő tengely: az ACE2/ANG (1–7)-Mas1 és az ANG IV-IRAP útvonalak mentén rendeződik. Ezek az utak, inkább az anti-inflammatorikus és az antioxidatív mechanizmusok aktiválása révén a neuroprotekcióban játszhatnak szerepet, de szerepük egyelőre kevéssé feltárt.



3. ábra Szisztémás és lokális agyi RAAS (saját ábra, rövidítések feloldását lásd a szövetben feljebb)

dc_1685_19 <u>II.2.3.3. Neuroendokrin hipotézis</u>

Az immunológiai és vazoregulációs faktorokon kívül mindkét betegség kialakulásának közös endokrinológiai/metabolikus oka a szénhidrát anyagcsere zavara: a hiperglikémia, az inzulinhiány/rezisztencia, melyek DM-ben játszott szerepét szükségtelen részletezni.

Ismert, hogy az inzulin az agyban jobban kötődik a kognitív és érzelmi funkciókért felelős területekhez [64]. Diabéteszes állatmodellben kimutatták, hogy az inzulin hiánya - a károsodott triptofán transzport következtében - csökkenti az agy szerotonin termelését [65], ami depresszió-szerű viselkedésmintát eredményez. A szerotonin rendszer működésének zavarát cukorbeteg gyermekekben is leírták [66]. Más feltételezések szerint ezekben a betegekben az ismétlődő hipoglikémiás állapotok is kognitív zavarokhoz vezethetnek, azonban a rendelkezésre álló adatok ellentmondásosak és a patomechanizmus sem tisztázott [67]. T2DM-ben végzett metaanalízisek bizonyították, hogy inzulinrezisztencia esetén a depressziós tünetek megjelenése gyakoribb [68] és nő az öngyilkosság kockázata [69]. Kimutatták továbbá, hogy az antidepresszáns kezelés az inzulinrezisztencia csökkentésében is hatékony [70], ami szintén a bidirekcionális összefüggést támasztja alá.

A HPA tengely hiperaktivitása közös jellemzője mindkét betegségnek. Depresszióban a HPA tengely funkcionális zavarai jól ismertek: a hipofízis hipertrofizál, nő a plazma és a likvór kortizol és kortikotropin-serkentő hormon (CRH) szintje [71]. DM-ben a megemelkedett pro-inflammatorikus citokin szintek (pl. IL-1, IL-6) a HPA tengely aktivációja révén fokozzák a CRH mennyiségét, növelik a kortizol szekréciót így hozzájárulhatnak a depresszió kialakulásához, romlásához [72]. A tartós túlműködés következményeként a HPA tengely későbbi stresszfaktorokra, mint például az inzulin-indukálta hipoglikémiára adott válasza is csökken [73].

II.2.3.4. Neurotrófikus hipotézis

A neurotrófikus elmélet szerint, molekuláris szinten a két betegség közötti kapcsolatot a neurotrofinok, elsősorban a brain-derived neurotrophic faktor (BDNF) jelentheti, mely neurotrófikus szerepe mellett, immunotrofin és metabotrofin tulajdonságokkal is bír.

A BDNF a neurotrofinok családjába tartozó fehérje, mely főként a központi és perifériás idegrendszerben termelődik, azonban nem-neurogén szövetekben is kimutatható. Fiziológás körülmények között a neuronok szintetizálják, de stresszhatásra (gyulladás, iszkémia, antidepresszánsok, stb.) az asztrocitákban is fokozódik az expressziója [74].

A BDNF elsősorban az idegsejtek túlélésében és növekedésében játszik szerepet, de számos tanulási és memória folyamatban is részt vesz. Először prekurzor formában termelődik az endoplazmatikus retikulumban (ER), melyből az érett forma proteolitikus hasítás révén alakul ki. A

prekurzorból az érett forma átalakulása intracellulárisan furin és konvertáz enzimek révén történik, valamint extracellulárisan plazmin és mátrix metalloproteináz 2 és 7 segítségével [75]. A keletkezett érett forma a tropomiozin receptor kináz B (TrkB)-hez kötődik, ezáltal elindítja a foszforilációs kaszkádot, mely során aktiválódnak az extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK), a foszfoinozitid 3-kináz (PI3K) és a foszfolipáz C (PLC) útvonalak. Ezek a szignáltranszdukciós mechanizmusok hozzájárulnak az axonok és dendritek növekedéséhez, a neurotranszmitterek szintéziséhez és felszabadulásához [76], valamint a pre- és a posztszinaptikus sejtek aktiválódási hatékonyságának növeléséhez [77] (*4. ábra*).

A korábbiakban úgy gondolták, hogy az extracelluláris térbe kijutó prekurzor forma inaktív, biológiai folyamatokat nem modulál. Később kimutatták, hogy a prekurzor BDNF kötődve a p75 neurotrofin receptorhoz (p75Ntr) [78] az NF-κB és JNK útvonalakon keresztül apoptózist és csökkent szinaptikus hatékonyságot idéz elő [79]. Ez a hatás ellentétes az érett BDNF-TrkB által aktivált mechanizmusokkal.



4. ábra A BDNF szignalizációs útvonalai (BDNF: brain-derived neurotrophic factor, TRAF4/6: TNF receptorassociated factor 4/6, RIP2: receptor interacting protein-2, JNK: c-Jun N-terminal kinase, NF-κB: nuclear factor kappa-B, , Shc: adaptor protein 1, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, SOS: son of sevenless, Gab1: GRB2associated-binding protein 1, IRS1/2: Insulin receptor substrate 1/2, Ras: small GTPase proteins, Raf: serine/threoninespecific protein kinases, MEK: mitogen-activated protein kinase kinase, ERK: extracellular signal–regulated kinases, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, Akt: protein kinase B, mTOR: mammalian target of rapamycin, , CREB: cAMP response element-binding protein, Cunha ábrája alapján módosítva) [77].

A BDNF szerepét a depresszió patomechanizmusában egyre több állatkísérletes és klinikai adat támasztja alá. Fontos kiemelni, hogy a központi idegrendszer különböző területein a BDNF kifejeződése és hatása eltérő: míg a hippokampuszban és a prefrontális régióban gátolja a depresszió tüneteit, addig a nucleus accumbensben és az amigdalában facilitálja a betegség kialakulását [80].

A hippokampuszban és a prefrontális régióban lokalizálódó neuronokra élettani körülmények között magas BDNF és TrkB szint jellemző, azonban depresszió során ez jelentősen csökken [81]. Depressziós, illetve öngyilkosságot elkövető betegek szérumában és plazmájában is alacsonyabb BDNF szinteket detektáltak [82], amely azonban a tüntetek enyhülésével ismét emelkedik a kezelés időtartalmától és az antidepresszáns típusától függően [83]. A közelmúltban végzett, 10 000 depresszióban szenvedő beteg bevonásával készült metaanalízis során is hasonló következtetéseket vontak le [84].

Bár a BDNF legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben szintetizálódik, az endotél sejtek, izomszövet, máj, zsírszövet, sőt az aktivált immunsejtek is termelik. Neurotrófikus szerepe mellett egyre inkább előtérbe kerülnek metabolikus funkciói is. Az inzulin, leptin, ghrelin és egyes gyulladásos citokinek aktivitásának szabályozásán keresztül befolyásolja a táplálékfelvételt, testsúlyt, vércukrot és az inzulin szenzitivitást, így fontos szerepet játszik a T2DM és obezitás patogenezisében [85]. *db/db* egerekben kimutatták, hogy a BDNF mérsékli az inzulinrezisztenciát, csökkenti a vércukorszintet és protektív hatású a hasnyálmirigy szigetsejtjeire [86]. Patkánymodellben igazolták, hogy a magas zsírtartalmú diéta következtében lecsökkent BDNF és TrkB fehérje szintje [87] rontja a progenitor idegsejtek proliferációját és a neurogenezist [88].

T2DM betegek plazmájában is alacsonyabb BDNF szinteket mértek, mely fordított korrelációt mutatott a vércukor értékével és a HOMA-indexszel [89]. Ezeket az eredményeket más klinikai vizsgálatok is megerősítették [90, 91], sőt leírták, hogy azokban a demenciában és kognitív zavarokban szenvedő betegekben, akik cukorbetegséggel is küzdenek, a BDNF szintje jelentősen alacsonyabb, mint a normoglikémiás csoportban [92]. Mindezek tekintetében megalapozottnak látszik a BDNF összekötő szerepe a DM és depresszió kapcsolatában, és felmerül a TrkB-BDNF útvonal jövőbeli terápiás potenciálja.

II.2.4. A Sigma-1 receptor

A BDNF upstream szabályozásában egyre inkább előtérbe kerül a Sigma-1 receptor (S1R) szerepe. A S1R egy 25 kDa molekulasúlyú transzmembrán polipeptid, két izoformája ismert, a S1R és a S2R, melyek szöveti specificitása és ligandkötő profilja eltérő. A továbbiakban csak a kutatásunkban résztvevő S1R kerül részletesebben ismertetésre. A S1R-ban két hidrofób α -hélix alkotja a transzmembrán részt, és mind az N-, mind a C-terminális vég az ER-ban van. A BDNF-hez

hasonlóan legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben a hippokampuszban, prefrontális kortexben és a striátumban expresszálódik, de kifejeződik a perifériás szervekben is, mint a máj, a szív, a hasnyálmirigy és a vese [93] (5. ábra).

Elsősorban a plazmamembránban és szubcelluláris membránokban, főként az ER-ben helyezkedik el, ahol nyugalmi állapotban komplexet képez a chaperone binding immunoglobulin fehérjével (BiP). Közvetlen vagy közvetett hatása van számos fehérjére, pl.: G-protein kapcsolt receptor (GPCR), ioncsatornára (Ca²⁺-, Na⁺-, K⁺- és Cl⁻⁻csatornákra), lipidre [94]. Hatását protein-kináz A, C, valamint B (Akt) enzimeken keresztül is kifejtheti, aktiválja az Akt-NOS jelátviteli útvonalat, serkenti a nitrogén-monoxid (NO) szintézist [95]. Az ER protein-egyensúlyában szerepet játszó enzimek közül az inozitolt igénylő kináz 1 (IRE1) stabilizálásával részt vesz az IP3-Akt útvonal aktiválásában [96]. Emellett szerepe van a sejt túlélésében a szintén az ER-ban található antiapoptotikus Bcl-2 protein, és az apoptotikus hatású bcl-2 associated X-protein (Bax) és kaszpáz-3 gátlása révén [97].



5. ábra A S1R transzmembrán szerkezete Monomer (a) és homotrimer (b) (S1R: sigma-1 receptor, ER: endoplazmatikus retikulum, SBDL: steroid binding domain like régió, Ossa ábrája alapján módosítva) [98]

A receptornak számos endogén (neuroszteroidok, dehidroepiandroszteron, progeszteron) és farmakológiai szempontból jelentős exogén (neuroleptikumok, antidepresszánsok, antipszichotikumok) liganduma ismert [99]. Agonista hatású ligand kötődésekor fokozódik a receptor mRNS expressziója fokozódik és nő a fehérje mennyisége, illetve a receptor kihelyeződik a plazmamembránba, ahol a Ca²⁺ dependens foszforiláció révén az intracelluláris jelátvitelt is befolyásolja [100].

Az idegrendszerben a S1R agonisták javítják a szinaptikus plaszticitást és az idegsejtek túlélését, nagyrészt a BDNF-TrkB szignalizációs út befolyásolása révén. *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján egyes S1R agonista kezelés hatására (pl. SA4503 vagy PRE-084) a BDNF mennyisége nő a hippokampuszban [101], a prefrontális kortex asztrocita és mikroglia sejteiben

[102], illetve aktiválódnak a fentiekben ismertetett TrkB mediált útvonalak. Ezzel párhuzamosan a S1R a jelátviteli folyamatokat más tirozin-kináz receptorokon, pl.: az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) [103] és a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR-β) [104] keresztül is aktiválhatja, ami esetleges patofiziológiai szerepét más kórfolyamatok kapcsán is felveti/megerősíti (pl.: fibrózis).

A S1R és a hangulatzavarok összefüggése az elmúlt évtizedben merült fel először, amikor több antidepresszánsról (fluvoxamin, fluoxetin, bupropion) igazolták, hogy kötődnek a S1R-hoz, és az antidepresszáns hatásuk S1R antagonistával felfüggeszthető. Kimutatták, hogy egyes endogén neuroszteroidok, mint a dehidroepiandroszteron (DHEA) vagy pregnolon antidepresszáns tulajdonsága is részben S1R mediált [105]. A S1R szerepe akkor vált egyértelművé, amikor megfigyelték, hogy a S1R knock-out (KO) egerek depresszióra jellemző tüneteket mutatnak [106], azonban a pontos molekuláris mechanizmus továbbra sem egyértelmű.

Az egyik lehetséges szabályozási útvonal a neutrofinokon keresztül valósulhat meg; számos szelektív szerotoninvisszavétel gátló (SSRI) növeli a BDNF expresszióját és aktiválja a jelátviteli mechanizmusokat. A S1R agonista SA4503 és PRE-084 kezelés növeli a BDNF expresszióját a depresszióért felelős agyi területeken, a hippokampuszban és a prefrontális kéregben és a TrkB jelátvitelen keresztül serkenti az idegsejtek működését [107]. Mindezek arra utalnak, hogy közvetlen szabályozás is van a S1R-BDNF között, de a kapcsolat szerepe a hangulatzavarok patofiziológiájában, különösen a DM-hez társuló depresszió patomechanizmusában egyelőre ismeretlen. Ennek a folyamatnak a feltérképezése kutatásaink egyik fő célja *(6. ábra)*.



6. ábra A cukorbetegség és depresszió közötti patofiziológiai összefüggések (HPA: Hipotalamusz-hipofizismellékvese tengely, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, saját ábra alapján módosítva) [108]

dc_1685_19 II.3. Diabéteszes vesekárosodás

A cukorbetegeknél jelentkező depresszió nem csupán az életminőséget és a glikémiás kontrollt rontja, de jelentősen növeli a többi szövődmény, így a vesekárosodás előfordulását és súlyosságát is.

II.3.1. A DKD epidemiológiája

A cukorbetegség a felnőttkori krónikus veseelégtelenség (KVE) legfőbb oka. A DKD talaján kialakuló KVE prevalenciája az utóbbi évtizedben megduplázódott [109]. A veseműködés beszűkülése esetén többszörösére nő a kardiovaszkuláris szövődmények kockázata, továbbá a dializáltak 5 éves túlélése mindössze 34%. [110]. A DKD 30-40%-ban felelős a felnőttkori végstádiumú veseelégtelenség (ESRD) kialakulásáért. A vesekárosodás T1DM-ben a betegek 30-40%-ában, T2DM-ben 20-30%-ban lép fel, átlagosan 10-15 évvel a cukorbetegség megállapítását követően. A vesekárosodás T2DM-ben már a cukorbetegség diagnosztizálásának pillanatában jelen lehet [111].

II.3.2. A DKD tünetei, diagnózisa

Közel 50 éve jelentek meg az irodalomban a hiperglikémiában észlelt megnövekedett albumin exkrécióról szóló első közlemények. A mikroalbumiúria (MA) kifejezést elsőként Viberti használta 1982-ben, a standard tesztcsíkkal nem detektálható mennyiségű albuminürítés megnevezésére [112]. Igazolta továbbá, hogy a MA megjelenése cukorbetegekben a vesekárosodás független prediktorának tekintendő.

A DKD klinikai képének és a szövettani változásainak összefüggését Gellman írta le elsőként 1959-ben diabéteszes betegek vesebiopsziáinak kapcsán [113]. Ennek alapján napjainkban a strukturális elváltozások szerint a DKD alábbi öt stádiumát különítjük el [114]. *(1)* A korai szakban (I.st.) renális hiperfiltráció és hipertrófia figyelhető meg, a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) nő a glomerulusok hipertrófizálnak, de a bazálmembrán és mezangium még ép szerkezetű. A <u>második stádiumában (II.st.</u>) intermittáló MA (30-300 mg/nap), szövettanilag a glomerulusok bazálmembránjának megvastagodása és a mezangiális mátrix felszaporodása figyelhető meg. Tartós MA a betegség <u>harmadik stádiumára (III.st.</u>) jellemző, ilyenkor a vérnyomás már határérték hipertóniát jelezhet, a GFR csökkenni kezd. A bazálmembrán vastagodás és mezangiális mátrix felhalmozódás további progressziója jellemző. A vesekárosodás előrehaladtával glomeruloszklerózis és az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék (kollagén I, III, IV és fibronektin) nagymértékű akkumulációja figyelhető meg. A *7. ábra* bemutatja a DM-re jellemző strukturális változásokat.



7. ábra Az egészséges és a diabéteszes vese struktúrális jellemzői Az ábra felső része a diabéteszes, az alsó része az egészséges glomerulust jelöli. (Thomas ábrája alapján módosítva) [115]

A <u>negyedik stádiumban (IV. st.)</u> nő az albuminvesztés (> 300 mg/nap, makroalbuminúria) és non-szelektív proteinúria jelenik meg. Szövettanilag a glomeruloszklerózis, ateroszklerózis és a krónikus tubulointerstíciális károsodás tovább súlyosbodik, mely az ép struktúra kiszorítása révén a vesefunkció beszűküléséhez vezet. A glomeruláris funkció romlása miatt csökken a vizeletképzés és a kiválasztás, ezáltal emelkedik a szérum kreatinin szint és nő a vérnyomás. Az <u>ötödik stádiumban (V.st.)</u> a működő nefronok száma jelentősen lecsökken, ami végül urémiához és veseelégtelenséghez vezet. A vese károsodása miatt lecsökkent eritropoetin termelés anémiát okoz. Zavart szenved a D-vitamin aktív formává alakulása, ami csökkent intesztinális kálcium felszívódással és fokozott csontvesztéssel jár. A lipid szintek (koleszterin, triglicerid) emelkednek [116]. A napi vizelet mennyisége egyre kevesebb, jellemző az ödéma, fáradékonyság, kialakul az ESRD *(8. ábra)*.



8. ábra A DKD lefolyása (GFR- glomeruláris filtrációs ráta, ESRD-végállapotú veseelégtelenség, RAAS-reninangiotenzin-aldoszteron rendszer, NTx-vesetranszplantáció, saját ábra) [117]

A DKD diagnózisa kimondható, amennyiben cukorbetegségben szenvedő betegnél 6 hónapon belül, háromból min. 2 alkalommal, éjszakai vagy a 24 órás gyűjtött vizeletben kóros albuminürítést (<30mg/24 óra), vagy beszűkült vesefunkciót észlelünk és egyéb eredetű vesebetegség kizárható. A mérést láz, infekció, menstruáció, hematúria, hipertónia vagy ACE gátlók (ACEi) használata esetén el kell halasztani, illetve kizárandó az ortosztatikus vagy mars-proteinúria jelenléte is. A legfrissebb ajánlások szerint a MA szűrésének megkezdése T1DM-ben korfüggő: (i) a pubertást megelőzően kialakult DM 2 éves betegségtartama esetén 11 éves kortól, (ii) 5 éves betegségtartam esetén 9 éves kortól indokolt. (iii) A pubertás idején manifesztálódó betegség esetében a diagnózis után 2 évvel végzendő el a MA szűrés, rizikócsoportokban (lányokban, dohányzókban, családi halmozódás esetén) előbb. A DKD szűrése T2DM diagnózisakor azonnal elvégzendő, tekintettel arra, hogy a cukorbetegség ilyenkor akár már 5-10 éve fennállhat [118].

Az utóbbi években egyre több vizsgálat kérdőjelezi meg a MA prediktív értékét a DKD kialakulását illetően [119, 120] és intenzív kutatások zajlanak új biomarkerek felfedezésére. Az egyik ilyen lehetőség a podociták kimutatása a vizeletben. A podociták számának csökkenése és a podocita citoszkeleton károsodása bizonyítottan kulcsszerepet játszik a DKD patogenezisében. Cukorbetegek vizeletében a podociták mennyisége arányos az albuminúria mértékével [121]. Állatkísérletekben már sikerült áramlási citométerrel is kimutatni a podocitákat a vizeletben, azonban módszer klinikai validálása még folyamatban van, rutin diagnosztikai gyakorlatra egyelőre nem alkalmas.

Az akut vesekárosodásban korábban már megbízható markerként azonosított neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) és kidney injury molecule-1 (KIM-1) a közelmúlt eredményei alapján a DKD igazolására is megfelelő lehet. T1DM-ben kimutatták, hogy mindkét fehérje mennyisége az albuminúria súlyosságával arányos mértékben megemelkedik [122]. Igazolták továbbá, hogy ACEi lizinopril adását követően a vizeletben ürülő NGAL mennyisége csökken [123]. Mindezek arra utalnak, hogy az új biomarkerek potenciálisan korábban jelezhetik a vesekárosodás meglétét, mint a jelenleg használt mérési módszerek. Mindaddig, azonban míg az új markerek validálása zajlik, az albuminúria és a kreatinin rendszeres mérése, illetve a GFR meghatározása jelenti a DKD szűrésének alapját mind a gyermek, mind a felnőtt cukorbetegek körében.

II.3.3. A DKD patogenezise

A vese a glükóz homeosztázisának szabályozásában elsősorban a renális glükóz reabszorpció révén vesz részt, melynek jelentős része a proximális tubulusokban a nátrium-glükóz kotranszportereken (SGLT) keresztül, inzulintól független módon valósul meg [124]. A proximális tubulus sejtek a glükózt energiaforrásként nem hasznosítják, így a visszaszívott glükóz csaknem teljes mennyisége visszakerül a peritubuláris- és szisztémás keringésbe és cukor a vizeletben nem jelenik meg [125]. A proximális tubulusban a glükóz 90-97%-ának visszaszívását az S1 szegmens luminális membránján lokalizálódó SGLT2 végzi. Ez a nagy kapacitású, de alacsony affinitású glükóz transzporter a nátriumot és a glükózt 1:1 arányban szállítja. A maradék 3-10% glükóz visszaszívása a kis kapacitású, magas affinitású glükóz/galaktóz transzporter, az SGLT1 révén zajlik. Az SGLT1 a proximális tubulus S2/S3 szegmensének luminális membránján fejeződik ki és 2 Na⁺-ot, illetve egy glükózt transzportál [126].

Az SGLT1 és SGLT2 transzportereken keresztül zajló glükóz reabszorpció a Na⁺/K⁺-ATPáz (NKA) által generált koncentráció grádiens mentén történik *(9. ábra*. Az apikális membránon történő visszaszívás után, a glükóz passzív transzporttal átjut a bazolaterális membránon, amit az S1 szegmensben a glükóz transzporter-2 (GLUT2), illetve az S2/S3 szegmensben a glükóz transzporter-1 (GLUT1) mediál [127].

Hiperglikémiás állapotban megnövekszik a filtrált glükóz mennyisége, így a reabszorpió mértéke is, ami az SGLT2 mennyiségének és aktivitásának növekedésével jár. [128]. DM-ben az transzporterek maximális reabszorpciós kapacitása kb. 20%-al nő. A kiválasztott glükóz mennyisége akár 500-600 g/nap is lehet 10-12 mmol/l vércukorszint és normál GFR mellett [129]. Ha a filtrált glükóz mennyisége meghaladja az SGLT-k transzportmaximumát, glükózúria lép fel [130].



9. ábra Glükózfelvétel a vesében (SGLT: nátrium-glükóz kotranszporter, Dr. Balogh Dóra PhD disszertációjából engedéllyel)

A DKD kialakulásához számos, egymással is összefüggő metabolikus és hemodinamikai út vezet. Kísérletes és klinikai tanulmányok sora bizonyítja a DKD komplex folyamatát, melyek ismertetése jóval meghaladja még egy doktori disszertáció kereteit is.

A krónikus hiperglikémia csaknem minden renális sejttípust érint, bár egyes sejtek érzékenyebbek a magas glükóz koncentráció okozta károsodásra. Mivel a proximális tubulusok glükóz felvétele inzulintól független ez különösen érzékennyé teszi őket a hiperglikémiás körülményekkel szemben [131]. A korai szakaszban a glükózterhelés hatására fokozódik a proximális tubulusban a glükóz reabszorpció, a tubulusok hiperpláziája és hipertrófiája következik be. A későbbiekben a hiperglikémia, a késői glikációs végtermékek (AGE) által indukálódó hexózamin és poliol útvonalak, a fokozott RAAS aktivitás és a tubuláris hipoxia hatására gyulladásos citokinek, növekedési faktorok és ECM komponensek termelődnek. Mindezek együttesen jelentős hemodinamikai változásokhoz vezetnek, tubulointerstíciális gyulladást és végső soron a fibrózis kialakulását okozzák [131-133]. Az alábbi ábra összegezi a legfontosabb mechanizmusokat, részletes ismertetésre továbbiakban csak a saját kísérleteink során tanulmányozott útvonalak kerülnek (*10. ábra*).



10. ábra A DKD kialakulásának mechanizmusai (RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer, IC: intracelluláris, ROS: reaktív oxigéngyökök, AGE: előrehaladott glikozilált végtermékek, PKC: protein kináz C, TGF-ß: növekedési faktor béta, PDGFB: trombocita eredetű növekedési faktor, NF-kB: Nukleáris faktor-kappa B, ECM: extracelluláris mátrix, MCP-1: Monocita kemoattraktáns protein-1) [117]

II.3.3.1. A DKD és RAAS aktiváció

A keringő RAAS mellett a vesében az összes RAAS elem kifejeződik és szabályozása a szisztémás RAAS-tól függetlenül is történhet. A hiperglikémia már önmagában kiválthatja a lokális RAAS "túlaktiválódását", amit az is bizonyít, hogy a proximális tubulus sejtek 24 órán át tartó magas glükózzal történő kezelése serkenti az angiotenzinogén mRNS expresszióját [134]. A DM korai szakaszában a proximális tubulusban szelektíven fokozódik a renin expresszió, ami a tubuláris ANGII emelkedéséhez vezet [135]. A lokálisan megnövekedett ANGII direkten fokozza a renális angiotenzinogén mRNS expresszióját, az így kialakuló ördögi kör tovább növeli a RAAS aktivációját.

A túlaktiválódott ANGII hatására emelkedik a renális transforming growth factor béta (TGF- β) expresszió, ami károsítja az afferens arteriolák autoregulációját, így emelkedik a glomeruláris intrakapilláris nyomás és a bazálmembrán fehérjeáteresztő képessége. Az ATR1-en keresztül növeli a vaszkuláris rezisztenciát, csökkenti a vese vérátáramlását, serkenti az ECM expanziót és hozzájárul az epitél sejtek hipertrófiájához, melyek mind a tubulointerstíciális fibrózis, mind a glomeruloszklerózis kialakulását triggerelik. A TGF- β mellett más profibrotikus faktoroknak, mint a
kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) és PDGFB, a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) mediált útvonalaknak, illetve különböző pro-inflammatorikus citokineknek is jelentős patognomikus szerepe van.

Az ANGII és hiperglikémia serkenti az aldoszteron termelődését is, ami tovább súlyosbítja az ANGII káros hatásait [136]. DM-ben normális plazma aldoszteron szintek mellett is emelkedett a renális aldoszteron mennyisége, ami önmagában is lokális gyulladást és fibrózist indukál, illetve fokozza az albuminúriát [137]. Emellett hozzájárul a kollagén termelődés és endotéliális diszfunkció kialakulásához tovább rontva a DKD progresszióját [138].

II.3.3.2. A DKD és O-GlcNAciláció

Az *O*-GlcNAciláció az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosulás, melyet az 1980-as évek elején írtak le először. Mivel ugyanazonon az oldalláncon megy végbe, mint a foszforiláció, ezért számos fehérje esetében (pl. eNOS) kompetícióba lép vele.

A folyamat során a glükóz a hexózamin útvonal (HBP) lépésein keresztül átalakulva a fehérjék szerin és treonin hidroxil csoportjaihoz kapcsolódik, mely a klasszikus glikációval ellentétben enzimatikusan szabályzott. A reakció során egyetlen *O*-GlcNAc csoport helyeződik át a fehérjékre az *O*-GlcNAc-transzferáz (OGT) segítségével, míg az eltávolítást az *O*-GlcNAcáz (OGA) katalizálja. Mindkét enzimnek több izoformája létezik, melyek mind funkciójukban, mind lokalizációjukban különböznek. A két enzim dinamikus egyensúlyban tartja a glikozilációt és deglikozilációt, illetve finom hangolja a különböző folyamatok jeláviteli útvonalait (*11. ábra*) [139].

Fiziológiás körülmények között a felvett glükóz kb. 2-5%-a halad át a HBP-n. DM-ben, illetve tartós hiperglikémia hatására ez az arány jelentősen megnő, ami fokozott és elhúzódó *O*-GlcNAcilációhoz vezet. Ez nemcsak a foszforiláció által szabályozott jelátviteli útvonalak gátlásával, hanem a transzkripció és fehérjefunkció befolyásolásával is károsítja a sejtfolyamatokat [140].

Az *O*-GlcNAciláció a DM patogenezisében számos helyen szerepet játszik. A megnövekedett HBP-n keresztüli glükózáramlás csökkent inzulinérzékenységet vált ki [141]. Hasnyálmirigy β-sejtekben a megnövekedett *O*-GlcNAciláció csökkenti az inzulinszekréciót és β-sejt apoptózist indukál [142, 143]. Kimutatták, hogy az inzulinkaszkád főbb alkotóinak (Akt, inzulin receptor szubsztrát-1) *O*-GlcNAcilálódása összességében rontja az inzulin jelátvitelt [144].



11. ábra Az *O*-GlcNAciláció folyamata (Gln: glicin, Glu-glükóz, Acetil-CoA: acetil-koenzim A, UTP: glükóz-1-foszfát uridiltranszferáz, UDP: glükóz-1-foszfát uridintranszferáz, OGT: O-GlcNAc transzferáz, GlcNAc: β-N-glükózamin, Ngoh ábrája alapján módosítva) [145]

Az *O*-GlcNAciláció számos renális transzkripciós faktor és profibrotikus fehérje termelődésének szabályozásában fontos szerepet tölt be; nagyjából mindegyik RNS polimeráz II transzkripciós faktor *O*-glikozilálódhat. Mezangium sejtekben a magas glükóz által létrejött HBP aktiváció a TGF- β , PAI-1 és fibronektin termelés fokozódásához vezet [146-148]. Az NF-K β *O*-GlcNAcilálódása megnövekedett TNF- α és vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (VCAM-1) termelődését okozza, ami hozzájárul a gyulladás és fibrózis kialakulásához DKD-ban [149].

Bár az eredmények zöme T2DM-re vonatkozik, az adatok egyértelműen alátámasztják az *O*-GlcNAciláció központi jelentőségét a DM és a glükotoxicitás indukálta renális szövődmények kialakításában.

dc_1685_19 <u>II.3.3.3. A DKD és hipoxia</u>

A vese oxigén ellátása a renális vérátáramlás, a GFR, az oxigén felhasználás és az arteriovenozus oxigén shunt komplex együttműködésének eredménye. Bár a vese a testtömeg kevesebb, mint 1%-a, oxigénfelhasználása meghaladja a teljes fogyasztás 10%-át, így igen érzékeny a hipoxiás károsodással szemben. Az O₂ jelentős részét a proximális tubulusokban lokalizálódó NKA használja fel, mely a szervezet homeosztázisának egyik fő regulátora.

A hipoxia jelentőségét a DKD kialakulásában számos tanulmány alátámasztja, és a jelenség az utóbbi évtizedben még inkább az érdeklődés középpontjába került. Körner Anna és mtsai. már 1994-ben leírták, hogy a streptozotocin (STZ) indukált T1DM-ben szenvedő állatokból izolált proximális tubulusok O₂ felhasználása jelentősen meghaladja a kontrollokét. [150]. Az elmúlt években számos modellben és különböző technikákkal hasonló eredményekre jutottak. Palm és mtsai. mikroelektródák segítségével kimutatták, hogy a cukorbeteg patkányokban lecsökken az O₂ nyomás [151]. A legújabb képalkotó technika, a blood oxygenation level-dependent (BOLD) MRI segítségével igazolták, hogy a hipoxia nem csak a kortikális területet, de a külső medullát is érinti [152]. A renális hipoxiára történő válaszként emelkedik a GFR, az SGLT-ken keresztül nő a nátrium és glükóz visszaszívás, ami az NKA fokozott aktivitásához és következményesen a megnövekedett O₂ felhasználáshoz vezet. Mindezek mellett a hiperglikémia miatt csökken a peritubuláris kapillárisok denzitása, ezáltal károsodik a tubulus sejtek O₂ ellátottsága, ami még érzékenyebbé teszi őket a hipoxiás károsodásra. Ezek a folyamatok együttesen vezetnek a szöveti O₂ nyomás csökkenéséhez.

A hipoxia kivédésére a sejtek különböző védekező mechanizmusokkal reagálnak (fokozódó eritropoézis, angiogenezis, stb.). Bár számos transzkripciós faktor és útvonal szerepe igazolódott, a hipoxia-indukált faktor (HIF) által mediált folyamatok kulcsfontosságúak [153]. A HIF egy heterodimer, mely élettani körülmények között degradálódik. Hipoxiában a degradáció gátlódik, ezáltal a HIF-1 α alegység a citoplazmából áthelyeződik a sejtmagba és ott a β alegységgel dimerizálódik. Az így képződött komplex számos gén (EPO, VEGF, GLUT-1) promóterén megtalálható hipoxia responisve elementhez kötődik, melyek szerepet játszanak a szöveti oxigenizációban (*12.ábra*).



12. ábra A HIF-1α útvonal szabályozása a hipoxiás válaszra (HIF: hypoxia-inducible factor, FIH: Factor-inhibiting hypoxia-inducible factor, HRE: hypoxia responsive elements, PHD: prolyl 4-hydroxylases, VHL: von Hippel-Lindau-E3, Dr. Balogh Dóra PhD disszertációjából engedéllyel)

Számos tanulmány veti fel a "krónikus tubuláris hipoxia hipotézist", mint a DKD kialakulásának kulcsmomentumát, mely nemcsak a károsodás progressziójában, de a veseműködés zavarának kezdeti szakaszában is kiemelt fontosságú [154-156]. Az oxigénhiány a tubulointerstíciális sejtek fibrotikus válaszát indukálja és fokozza a miofibroblasztok differenciációját. Az alacsony O₂ tenzió következtében nő a kollagén I termelődése, csökken az mátrix metalloproteináz (MMP)-2 expressziója, ami az ECM felszaporodásához vezet [157]. A HIF aktivációja a tubulointerstíciális fibrózis indukálásában is lényeges faktor, mivel közvetlenül szabályozza a PAI-1, a TGF-β és a CTGF transzkripcióját, ezáltal hozzájárul a tubuláris atrófia és az interstíciális fibrózis kialakulásához [158].

Mindezek a folyamatok összességében, a tartós hiperglikémia okozta glükóztoxicitás, a kórosan aktivált RAAS, a hipoxia, az oxidatív stressz és a pro-inflammatorikus citokin hatások ördögi kört kialakítva a vesében renális fibrózis kialakulásához, teljes strukturális és funkcionális károsodáshoz vezetnek.

II.3.4. A DKD és fibrózis

A tubulointerstícium egészséges vesében néhány sejttípusből (pl. rezidens fibroblasztok, limfociták), vaszkuláris és ECM komponensekből áll. A fibroblasztok és a tubuláris epitél által termelt ECM kollagénekből, retikuláris rostokból és a tubuláris bazálmembránból épül fel. A fibrózis

a természetes sebgyógyulás része, a szervezetnek a sérülésre adott olyan válasza, melynek célja az eredeti szövet strukturális és funkcionális helyreállítása. A fibrózist gyulladás előzi meg, amely szükséges a gyógyulási folyamatokhoz, a parenchimális sejtek regenerációjához és a sérülés fibrotikus szövettel való kitöltéséhez [159]. A szöveti sérülésre adott gyulladásos válasz elindíthat egy természetes szövetgyógyulási folyamatot vagy akár abnormális, kontrollálatlan szövetproliferációt is, ami a szövet eredeti integritásának elvesztésével fibrózishoz vezet.

A DKD korai szakaszában a glomeruláris elváltozásokat tubuláris atrófia és tubulointerstíciális fibrózis előzi meg vagy kíséri. A kezdeti szakaszban a tubuláris, perivaszkuláris és mononukleáris sejtek szaporodni kezdenek, profibrotikus faktorokat termelnek (TGF- β , CTGF, PDGFB) ezáltal a rezidens fibroblasztok miofibroblasztokká transzformálódva felhalmozódnak az interstíciumban. A miofibroblasztok a fibroblasztok differenciálódásán kívül származhatnak a hepatocitákból, epitél sejtekből (EMT: epiteliális-mezenchimális tranzíció), endotéliumból (EndoMT: endoteliális-mezenchimális tranzíció), pericitákból és fibrocitákból is [160]. A miofibroblasztok kontraktilis sejtek, melyek nagy mennyiségű α -simaizom aktint (α -SMA) expresszálnak, megjelenésükkel párhuzamosan az ECM komponensek (pl. kollagén-1-III, fibronektin, MMP-k) szintézise is fokozódik, az egészséges struktúrák helyén funkcióképtelen hegszövet keletkezik (*13. ábra*) [161].



13. ábra A renális fibrózis részfolyamatai (TNF: Tumor nekrózis faktor, CCL5: Chemokine ligand 5, PAI-1: Plazminogén aktivátor inhibitor-1, EMT-epiteliális mesenchimalis tranzíció, α SMA: α simaizom aktin, TGF- β : növekedési faktor béta, PDGFB: trombocita eredetű növekedési faktor, CTGF: kötőszöveti eredetű növekedési faktor, ANGII: angiotenzin II, MMP: mátrix metalloproteinázok, Zhou ábrája alapján módosítva) [162]

Az ECM képződése és lebomlása során specifikus pro-kollagén terminális fragmentumok és úgynevezett fehérje neo-epitópok keletkeznek, melyek a vizeletbe szekretálódva non-invanzív biomarkerként alkalmasak lehetnek a vesefibrózis korai diagnosztizálására [163]. A neo-epitóp fehérjék közé tartozik az MMP-9 mediálta III-as típusú kollagén degradációjából származó fragmentum (C3M) és a IV-es típusú kollagén α3 lánca a tumstatin, melyek klinikai kipróbálása és az USA Élelmezési és Gyógyszerügynökség (FDA) engedélyeztetése folyamatban van és további kísérletes megerősítésekre vár [163].

II.3.5. A DKD kezelése

Mivel a DKD kialakulásának elsődleges oka a krónikus hiperglikémia, ezért a terápia fő célja az euglikémiára (normális vércukor - és HbA1c – értékre) való törekvés [164]. Az American Diabetes Association (ADA) ajánlások alapján a glikémiás célértékek kijelölésénél figyelembe kell venni a beteg korát, a társbetegségeket és a várható élettartamot. A Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) és ADA irányelvei szerint a HbA1c célértéke 7%. A vérnyomást tartósan 140/90 Hgmm alatt kell tartani, bár ideálisabb a 130/80 Hgmm célérték kijelölése. Mindezek figyelembevételével akár 50%-kal is csökkenthető a mikrovaszkuláris komplikációk (retinopátia, neuropátia, de főleg a DKD) kialakulásának esélye [165].

A hazai és nemzetközi ajánlások szerint mikro- vagy makroalbuminúria esetén hipertónia hiányában is javasolt az AT1R blokkolók (ARB) vagy ACEi adása; mindkét gyógyszer alkalmas a DKD progressziójának lassítására [166]. ARB vagy ACEi intolerancia esetén az egyik készítmény helyettesíthető a másikkal. A proteinúria hatékonyabb csökkentésének érdekében felmerült az ARB és ACEi együttes adása, azonban az újabb tanulmányok szerint a kombinált terápia nem eredményesebb a vesebetegség kezelésének szempontjából. Ezzel szemben a kombináció fokozhatja egyes mellékhatások, mint hiperkalémia, hipotenzió, szívelégtelenség kialakulásának valószínűségét és növelheti az összmortalitást [167, 168].

T1DM és T2DM betegen végzett vizsgálatok alátámasztják, hogy a RAAS-gátlók körébe tartozó mineralokoritokoid receptor (MR) antagonisták hatékonyan csökkentik az albuminúriát és lassítják a vesefunkció romlását [169]. Az MR antagonisták monoterápiás alkalmazásáról egyelőre kevés adat van. Makhlough és mtsai. utánkövetéses vizsgálatban igazolták, hogy a spironolakton monoterápiában is ugyanolyan hatékonyan csökkenti a mikroalbuminúriát DKD-s betegekben, mint ARB-vel kombinációban [5], de a monoterápiás alkalmazás egyelőre nem került be sem a hazai, sem a nemzetközi ajánlásokba. Az MR antagonisták alkalmazása esetén hiperkalémizáló hatásuk miatt a szérum kálium szint fokozott ellenőrzése szükséges.

A gyógyszeres terápia mellett a kezelés fontos eleme a fehérje- és sóbevitel csökkentése (napi fehérjebevitel: <0,8 g/ideális testsúly kg, sóbevitel: 3g/nap). Tekintettel arra, hogy a dohányzás a DM és a vesekárosodás független rizikófaktora, a dohányzás elhagyása és az alkoholfogyasztás mérséklése is ajánlott [14, 170].

Ezek a szerek csak lassítják a progressziót, megelőzésre, a már meglévő károsodás visszafordítására kevéssé alkalmasak, ezért folyamatos kutatás zajlik új célmolekulák azonosítására, és új terápiás megoldások felfedezésére, saját vizsgálataim jelentős részének is ez az elsődleges célja.

II.3.5.1 Új szerek kísérleti fázisban a DKD terápiájában

Antifibrotikus szerek (TGF-β inhibitorok): Az egyik legígéretesebb gyógyszercsoportot a TGF-β gátlók jelentik, elsősorban a pirfenidone, melyet eredetileg idiopátiás pulmonáris fibrózis kezelésére törzskönyveztek. Állatkísérletes és *in vitro* vizsgálatokban ez a kis molekulasúlyú szintetikus molekula már négy hetes kezelés során hatékonyan csökkentette az ECM expanziót és az albuminúriát [171]. Az első fázis vizsgálatokban 77 DKD betegen végeztek 54 héten keresztül tartó placebo-kontrollált, kettős-vak tanulmányt kis dózisú (1200 mg/nap) és nagy dózisú (2400 mg/nap) pirfenidonnal. A kis dózis csökkentette a GFR beszűkülését, bár a fehérjeürítésen nem változtatott. A veseműködés számottevő javulása a kezelés megkezdése után 3-6 hónappal jelentkezett, ami arra utal, hogy nem hemodinamikai hatásról van szó. Idén kezdődik a TOP-CKD fázis II vizsgálatba történő betegbevonás, ahol nem csak DKD-ban hanem más etiológiájú KVE-ben szenvedő betegekben értékelik a pirfenidone hatékonyságát a renális fibrózis kivédésében. Az első eredmények négy év múlva várhatók.

Anti-inflammatorikus szerek: Az anti-inflammatorikus és antioxidáns hatású szintetikus triterpenoid bardoxolone állatkísérletekben gátolta a DKD kialakulását. A közelmúltban lezárult fázis-II (BEAM) vizsgálatban T2DM-ben egy éven át *per os* adott bardoxolone-metil már 8-12 héttel a kezelés megkezdését követően növelte a GFR-t [172]. A következő fázis-III tanulmányt (BEACON), idő előtt le kellett zárni, mert bár a GFR csökkent, a betegek számottevő részében nőtt a vérnyomás és fokozódott a kardiovaszkuláris események száma [173]. Mindezek ellenére, saját korábbi fázis II vizsgálatai sikereikből kiindulva Japánban 2018-ban új fázis III kísérletet indítottak (AYAME), melybe 1000 DKD harmadik, negyedik stádiumában szenvedő, negatív kardiovaszkuláris anamnézissel, illetve normális B-típusú natriuretikus peptid (BNP) szinttel rendelkező egyént vontak be. A vizsgálat sikerrel lezárult, az első eredmények jövő év elejére várhatók.

SGLT2 gátlók (gliflozinok): Új antidiabetikum bevezetése esetén, 2008-óta az FDA megköveteli a kardiovaszkuláris biztonságosság kimutatását. Ezen multicentrikus vizsgálatok során (EMPA-REG OUTCOME - empagliflozin; CANVAS - canagliflozin, DECLARE-TIMI -

dapagliflozin) derült ki, hogy ezek a szerek a vércukorszint csökkentése mellett mérsékelik a szívelégtelenséget és javítják a vesefunkciót. Mindezekből kiindulva elindították a CREDENCE vizsgálatot, ahol T2DM mikroalbuminúriás cukorbetegekben igazolták, hogy a bázisterápiaként adott RAAS gátló mellett canagliflozint is kapó betegekben az ESRD kialakulása lassabb és a veseeredetű halálozás 34%-kal csökken [174]. Az újabb vizsgálat a dapagliflozinnal végzett DAPA-CKD várakozáson felüli jó eredményeket hozott, ezért idő előtt leállították. A 4200 DKD-ban és más etiológiájú KVE-ben szenvedő betegen végzett multinacionális vizsgálat első eredményeinek nyilvánosságra hozatalát 2020 őszére ígérik. Bár a pleiotróp, vércukorcsökkentő hatástól független protektív molekuláris mechanizmusok még nem egyértelműek, a biztató adatok alapján úgy tűnik, hogy az SGLT2 gátlók a vesekárosodás megelőzésének hatékony új szerei lehetnek a közeljövőben, akár nem csak cukorbetegekben.

Mindaddig, míg ezek az új készítmények nem kerülnek bevezetésre, a nagyszámú randomizált vizsgálat alapján úgy tűnik, hogy az aktuális protokollokkal kellő mértékben nem lassítható a DKD progressziója, a betegek jelentős hányadánál ESRD alakul ki. Ha a GFR 20 ml/min/1,73m² alá csökken, akkor vesepótló kezelés, dialízis, illetve vesetranszplantáció (KTx) válik szükségessé. Amennyiben DM áll a veseelégtelenség hátterében, akkor már 30 ml/perc/1,73 m² érték alatt is vesepótló kezelés indokolt.

II.4. Vesetranszplantáció

Napjainkban világszerte közel 5 millió (95% CI 4,438-5,431 millió) ember részesül vesepótló kezelésben, de még a konzervatív számítások szerint is ez csak a fele a terápiára szorulóknak [111]. A nemzetközi trendekkel párhuzamosan Magyarországon is folyamatosan nő a vesepótló kezelésre kényszerülő betegek aránya, számuk az elmúlt 15 évben megduplázódott, napjainkra eléri a 15 000et [175]. A dialízis a jelentős életminőségbeli csökkenés mellett, szignifikánsan növeli a mortalitást; a betegek halálozása 6,7-8,5-szerese az azonos életkorú átlagpopulációénak, míg transzplantált betegek esetében csak 1,3-1,6-szor nagyobb.

A betegek többségének kezelésére a dialízis valamelyik módja használható, KTx-re mégis csak mintegy 15-20%-uk alkalmas. Az elmúlt évtizedben folyamatosan nőtt a várólistán lévők aránya, míg az átültetések száma nagyjából stagnált. Biztató eredmény, hogy ez a tendencia az elmúlt három évben világszerte lassulni, megállni látszik, mely részben az élődonoros KTx növekedésének és az új szabályozások (donorkritériumok kiterjesztése) bevezetésének köszönhető [111].

Az élődonoros transzplantáció kimenetele kedvezőbb. A hideg iszkémiás idő (CIT) az előre tervezhető átültetés miatt rövidebb, kevesebb az akut rejekció és a graft működés megkésett beindulása (delayed graft function, DGF), valamint a donorok jellemzően fiatalabbak és

egészségesebbek. Az USA-ban és a skandináv országokban az átültetések több, mint harmada, Nyugat-Európában 20%-a, Magyarországon 10-12%-a élődonáció *(14. ábra)*. Hazánk 2012-ben csatlakozott az Eurotranszplant hálózathoz, ekkor volt a legtöbb élő donoros Ktx [171]. Az egyértelmű előnyök mellett ugyanakkor egyre több irodalmi adat veti fel az élődonáció hosszútávú egészségkárosító hatását a donor szempontjából [176].



14. ábra Szervdonációk száma Magyarországon (1997-2019) (OVSZ ábrája alapján módosítva) [177]

A KTx sikerét a vese hosszútávú működése határozza meg leginkább. Bár az akut kilökődések száma jelentősen csökkent köszönhetően a sebészi technika fejlődésének és az immunszuppresszív terápia fejlődésének, a hosszú távú kimenetel érdemben nem javult az elmúlt évtizedekben. A hosszútávú túlélést számos alloantigéntől függő (humán leukocita antigén (HLA) kompatibilitás, immunizáció), illetve alloantigéntől független faktor (donor neme, kora, dialízisen eltöltött idő, társbetegsége stb.) határozza meg. Az alloantigéntől független tényezők közül talán az egyik legfontosabb a graft iszkémia/reperfúziós károsodása (IRI), mely a szállítás alatti hideg iszkémiás, illetve a Tx során elszenvedett meleg iszkémiás károsodás következménye. Az IRI elkerülhetetlen és egyértelműen befolyásolja a graft működését: a CIT hossza korrelál a DGF gyakoriságával [178].

A hideg iszkémiás károsodás mérséklésére a graftot a donorból történő eltávolítást követően prezervációs folyadékkal perfundálják majd a beültetésig abban tárolják, így a graft akár 24-35 órán át életképes maradhat. Több folyadék van használatban a világon, a legelterjedtebb a University of Wisconsin (UW) és a hisztidin-triptophan-ketoglutarát (HTK), az újabbak ezek előnyeit próbálják kombinálni [179]. Számos törekvés zajlik a prezervációs oldat tökéletesítésére, próbálkoznak a

hőmérséklet emelésével, a folyadék összetételének megváltoztatásával, folyamatos perfúzióval. Minden új megoldás fontos előrelépést jelent a hideg iszkémiás károsodás csökkentésére.

II.4.1. Az iszkémia/reperfúziós károsodás

Az IRI közvetlenül az átültetést követően a primer nem működő graft, a DFG, illetve a károsodást kísérő pro-inflammatorikus citokin válasz miatt kialakuló akut antitest-mediált rejekció egyik legfontosabb meghatározó tényezője. A károsodás miatt hosszútávon a graftban progresszív interstíciális fibrózis és tubuláris atrófia alakulhat ki, mely a graft krónikus diszfunkciójához, akár kilökődéséhez vezet.

Renális IRI a keringés centralizáció következtében a KTx-en kívül számos esetben kialakulhat, mint súlyos hipotenzió (intraoperatív vagy vérzés okozta), volumenhiány (profúz hányás, hasmenés, kiterjedt égési sérülés), szívelégtelenség, vagy szupraaortikus műtétek során is. Az IRI károsodás mérséklésére irányuló törekvések tehát nem csak az átültetések sikerességének javítása szempontjából fontosak, de elektív nagy műtéteknél (pl. tumor rezekció) is jelentős haszonnal bírnak. Kutatásaink egyik fő érdeklődési területe a vese IRI folyamatának megismerése, különös tekintettel az iszkémiás inzultussal szemben tapasztalt nemi különbség hátterének felderítésére.

II.4.2. Az IRI patofiziológiája

A IRI komplex patofiziológiai folyamat, melyet endotél diszfunkció, fokozott sejthalál, a veleszületett és az adaptív immunválasz aktiválódása és számos transzkripciós átalakulás jellemez. Az iszkémiás periódusban a mitokondriális funkciók irreverzibilis károsodása és a vese véráramlás csökkenése következtében a sejtek adenozin-trifoszfát (ATP) raktárai kimerülnek, ez az ATP igényes folyamatok csökkenéséhez, illetve leállásához (membrántranszport folyamatok, protein szintézis, lipogenezis) vezet. Az ATP szint csökkenéssel párhuzamosan nő az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció. A transzportfolyamatok gátlása Na⁺ retenciót és következményes vízbeáramlást okoz, ami az endotélsejtek duzzadását eredményezi. Ez lokális hemokoncentrációhoz, fokozott viszkozitáshoz és a hemodinamikai viszonyok megváltozásához vezet. A kapilláris keringést tovább rontja a vér sejtes elemeinek acidózis okozta csökkent rugalmassága. Ezek a változások együttesen akár a kapillárisáramlás megszűnését is okozhatják [180].

Az iszkémia okozta szöveti károsodás mértéke függ az iszkémiás periódus hosszától és az azt követő reperfúziótól. A reperfúzió ugyan elengedhetetlen az iszkémiás szövetek túlélése szempontjából, paradox módon mégis súlyosbítja a szöveti károsodást, ugyanis a reperfúzió során keletkező reaktív oxigéngyökök lipidperoxidációt, DNS-degradációt, illetve a poliszacharid-depolimerizáció növekedését okozzák. Tehát a kezdeti iszkémiás károsodást a reperfúzió okozta

károsodás súlyosbítja [181].

Míg az iszkémiás periódus főként a kapillárisok vérátáramlását csökkenti, addig a reperfúzió során elsősorban az endotél sérülése dominál. A felszabaduló lokális vazokonstriktorok (endotelin), illetve a leukociták aktivációja és a posztkapilláris venulák endotéljéhez való kitapadása az endotél integritásának megszűnéséhez és a plazma makromolekuláinak extravazációjához vezet. A reaktív oxigéngyökök (ROS) aktiválják a neutrofil granulocitákat és a trombocitákat. Az aktivált leukociták további oxidánsokat és mediátorokat szabadítanak fel (platelet activating factor, citokinek, hisztamin), amik circulus vitiosust alkotva tovább csökkentik az endotél integritását, fokozzák az interstíciális ödémát és a gyulladást [181].

Az iszkémia, valamint a következményes vazokonstrikció és érelzáródás az oxigenizáció csökkenésével a tubulus sejtek károsodásához vezet. Az iszkémiára a proximális tubulusok és a felszálló vastag szegmentum a legérzékenyebbek, ugyanis élettani körülmények között is itt a legalacsonyabb az oxigénellátottság, valamint az itt található, a tubulus működésében kulcsfontosságú enzim, az NKA működése is igen energiaigényes. A károsodás miatt létrejött ATP-hiány, a bazolaterális membrán szétesése és a ROS toxikus hatása következtében az NKA működése zavart szenved. Korábbiakban igazoltuk, hogy az NKA a bazolaterális membránról a citoplazmába helyeződik át, ezáltal deaktiválódik és a hozzá kapcsolt másodlagos transzportfolyamatok szintén leállnak, a tubulus sejtről eltűnik a kefeszegély, sérül a sejt polaritása és integritása [182]. A károsodott tubulus sejtek egy része nekrózison, illetve apoptózison megy keresztül.

A peritubuláris kapillárisokban pro-inflammatorikus citokinek és vazoaktív mediátorok (intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM), IL-18) szabadulnak fel, valamint eleinte neutrofil és makrofág, később T-limfocita infiltráció figyelhető meg. A gyulladásos mediátorok hatására az interstíciális térben található fibroblasztok egy része miofibroblaszttá transzformálódva fibrotikus folyamatokat indít el [183]. A tubulus sejtek önmaguk is termelnek pro-inflammatorikus citokineket (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, monocita kemoattraktáns protein-1) és profibrotikus faktorokat (TGF- β), mely tovább fokozza a károsodást.

A sérült sejtek fehérje fragmentumai összecsapzódva a tubulus lumenébe jutnak, ahol a tubulus elzáródását, az intratubuláris nyomás emelkedését, a GFR csökkenését és a vesefunkció romlását eredményezik. A fenti folyamatokat a *15. ábra* összegzi.



normál állapot \rightarrow iszkémiás inzultus \rightarrow károsodott szerkezet

15. ábra A peritubuláris kapillárisokban és a proximális tubulusban iszkémiás károsodásra bekövetkező változások (DC: dentritikus sejt, Bonventre ábrája alapján módosítva) [183].

II.4.3. Citoprotektív mechanizmusok az IRI-vel szemben

A károsodás helyreállításában a citoprotektív mechanizmusok aktiválódnak, de számos tényező és a pontos hatásmechanizmus részleteiben még nem tisztázott. Az alábbiakban csak a saját vizsgálataink szempontjából fontos faktorok kerülnek részletesebb bemutatásra.

A vazodilatátor hatású nitrogén-monoxid (NO), nitrogén monoxid szintáz (NOS) enzim hatására termelődik, melynek három izoformája ismert, a konstitutív endoteliális és neuronális (eNOS, nNOS), valamint az indukálható (iNOS). A vesében mindhárom NOS izoforma expresszálódik, eltérő mennyiségben és lokalizációban. Az eNOS a glomeruláris endotél sejtekben, a proximális tubulusokban, a gyűjtőcsatornákban, valamint a Henle-kacs felszálló vastag szegmentumában található. Az nNOS elsősorban a makula denzában és az idegsejtekben expresszálódik, az iNOS pedig a mezangiális és proximális tubulus sejtekben, illetve a medulláris felszálló vastag szegmensben fejeződik ki [184]. Az eNOS és nNOS Ca²⁺-függő, míg az iNOS Ca²⁺független. Az eNOS inaktív állapotban a heat shock protein-90-hez (HSP-90) kötve van jelen a citoplazmában, aktiválásában az Akt jelátviteli útvonalnak fontos szerepe van, melynek hatására a HSP-90-ről leválik és foszforilálódik. A szerin/threonin-kináz családba tartozó Akt, az IP3 útvonalon keresztül foszforilálódik, az így aktiválódott fehérje, a citoplazmából a sejtmagba kerül, ahol további fehérjék foszforilációjával számos downstream utat indukál. IRI károsodást követően az egyik legfontosabb szerepe a sejt apoptózisának gátlása, a kaszpáz-9 és a Bax/Bcl-2 foszforilációja révén [185]. A termelődő NO növeli a renális perfúziót, a renin elválasztás gátlásán keresztül csökkenti a vérnyomást, valamint nátriurézist és diurézist okoz. A trombocita aggregáció, a leukocita adhézió és az ér simaizomsejt proliferációjának szabályozása révén jelentős szerepet játszik a vesekeringés stabilizálásában [186].

Az apoptózis folyamata pro- és anti-apoptotikus faktorok expressziós egyensúlyának eredménye. IRI hatására a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) is indukálódnak. A MAPK családba négy parallel szerin/threonin kaszkád tartozik, az ERK1/2, a JNK, a p38 és az ERK5. Ezek a vesén belül eltérő mennyiségben és lokalizációban expresszálódnak, funkciójukat illetően az irodalom igen ellentmondásos. Összességében úgy tűnik, hogy az ERK1/2 és az ERK5 elsősorban a sejtek túlélésében, míg a p38 és a JNK útvonal az apoptózisban játszik szerepet, de a folyamatokat számos más szignalizációs útvonal, így a p53, a PI3K/Akt és az NF-κB is befolyásolja [187].

A tubuláris hipoxiára adott válaszként aktiválódik a HIF útvonal is, mely a 3.3.3 alfejezetben ismertetésre került. Ezzel párhuzamosan az ATP hiány következtében megnő a hősokk-faktor-1 (HSF-1) expressziója. A hősokk válasz központi regulátora a HSF-1, mely fiziológiás körülmények között a citoszolban HSP-90-hez kötve található, stimulus hatására a sejtmagba vándorol és beindítja a HSP-k transzkripcióját. Iszkémiás károsodást követően a legtöbb fehérje szintézise gátlódik, ezzel szemben a HSPk mRNS és fehérje szintje gyorsan és jelentős mértékben (15-25%-kal) megnő [95]. A stresszfehérjék chaperone funkciójuk révén részt vesznek a mitokondriumok károsodásának kivédésében és a sejtszerkezet megőrzésében [185]. IRI során, ATP hiányában a HSP72 a károsodott proteinek hidrofób felszínéhez köt és ezáltal mintegy "kivonja a forgalomból" a denaturált fehérjéket. A véráramlás megindulásával az ATP hidrolízise során keletkező energiát felhasználva, a HSP72 konformációváltozáson megy át és képessé válik a károsodott proteinek térszerkezetének stabilizálására, valamint a helyreállított fehérjék elengedésére [188].

A HSP-27 a kis molekulasúlyú HSP-k családjába tartozó, egy aktin-specifikus chaperon, mely élettani körülmények között a sejtek migrációjában, növekedésében, differenciálódásában, túlélésében játszik szerepet. Elsősorban a vázizomban és a szívben fejeződik ki, de kisebb mennyiségben a vese kortikális és medulláris állományában is megtalálható. Károsító noxa (iszkémia vagy hiperglikémia) hatására szintézise megnő, immunhisztokémiai vizsgálatok a proximális tubulusok területén detektálták a legnagyobb expresszió növekedést [189]. Egyes proinflammatorikus faktorok (TNF-α, macrophage inflammatory protein-2) gátlásával csökkenti a

neutrofil granulocita infiltrációt, a kaszpáz-rendszer gátlása révén pedig elsődleges szerepe van az apoptózis megelőzésében is [190]

A depresszió patofiziológiájának kapcsán már bemutatott S1R egyes álláspontok szerint szintén a kis molekulasúlyú chaperonok családjába tartozik, és fontos szerepe lehet az IRI-t követő citoprotektív folyamatokban. Többféle oligomer formában is jelen van, feltehetően a monomer vagy a dimer alak az aktív, míg a tetramer és az oktamer formák inaktívak. Dajkafehérje tulajdonságára utal központi jelentősége a Ca²⁺ homeosztázis szabályozásában, az oxidatív stresszel szembeni védekezésben, illetve a sejtek (elsősorban a neuronok) növekedési és érési folyamataiban. A legtöbb nagymolekulájú chaperonnal (pl. HSP70, HSP90) szemben, nem kötődik az ATP-hez, transzmembrán lokalizációja és ioncsatornákat, illetve más molekulákat (G-protein kapcsolt fehérjék) szabályozó tulajdonsága pedig megkülönbözteti a többi kismolekulasúlyú dajkafehérjétől. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az evolúciós szempontból igen konzervált struktúrájú, számos regulációs folyamatban központi szerepet betöltő S1R speciális chaperonként jellemezhető [191]. Több útvonalon zajlik a szabályozása, részleteiben egyik sem ismert. Inaktív állapotban egy másik chaperonhoz, a BiP-hez (HSP70-5) kötődik, agonistái a BiP-ről leválasztva aktiválják. Az ER-ban található Ca²⁺ erősíti a S1R-BiP kapcsolatot, míg IP3 hatására a Ca²⁺ szint csökken, a S1R leválik a BiP-ről és aktiválódik [95].

Tekintettel arra, hogy funkcióját a központi idegrendszeren kívül a közelmúltig szinte egyáltalán nem vizsgálták, nem meglepő, hogy protektív szerepét az IRI károsodással szemben is az agyban tanulmányozták elsőként. Az arteria cerebri media elzárásával előidézett sztrók modellben kimutatták, hogy S1R agonista (dimemorfan) adása csökkenti az infarktusos terület nagyságát, javítja a sejt túlélést és csökkenti a gyulladásos választ [192]. Patkány embolizációs sztrók modellben szelektív S1R agonista PRE-084 adásával hasonló eredményre jutottak, a kezelést követően nőtt az anti-inflammatorikus citokinek (IL-10, IL-4) mennyisége, csökkent a károsodott terület kiterjedése és a neurológiai deficit [193].

A közelmúltban egy-egy kísérletben már perifériás szervekben is vizsgálták a S1R agonisták protektív szerepét. Nyomásterheléses kardiális hipertrófia modellben kimutatták, hogy az Akt-eNOS útvonal indukálásával a kezelés csökkenti a miokardium károsodását [194]. Egy másik, aorta leszorítás indukálta iszkémiás modellben a fluvoxamin védő hatását sikerült igazolni [195]. Máj hipotermiás iszkémiás modelljében nem szelektív S1R agonista adását követően enyhébb mitokondriális károsodást és jobb májfunkciót detektáltak [196]. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a S1R releváns új célmolekula lehet a vese IRI károsodásának kivédésében és ezáltal sikerrel alkalmazható a veseátültetések sikerének növelésében.

dc_1685_19 III. CÉLKITŰZÉSEK

In vitro körülmények között, illetve rágcsálómodelleken az alábbi kérdésekre kerestük a választ a fő vizsgálati témakörökben:

T1DM és DEPRESSZIÓ

- 1. T1DM-ben a krónikus hiperglikémia következtében kialakul-e depresszió az állatokban?
- 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 depressziós tünetek kialakulásához?
- 5. Milyen ANG-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 T1DM indukálta vesekárosodás kialakulását?
- 11. Milyen hatásmechanizmusok állhatnak a dapaglilflozin 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 fiziológiás körülmények között, illetve renális IRI károsodást követően?
- 16. Renoprotektív hatású -e a S1R agonista kezelés a vese IRI károsodásával szemben?
- 17. Milyen molekuláris mechanizmusok jászhatnak 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 KTx-et követően?

dc_1685_19 IV. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS MÓDSZEREK

Munkánk során külön figyelmet fordítunk a kísérleti állatok számának csökkentésére az állatkísérletek. Ahol lehetett, a kezelési szerek hatékonyságát, az alkalmazható dózisokat és toxicitásukat előzetes kísérletekben *in vitro* vizsgáltuk humán és állati eredetű sejtvonalakon. Elsősorban human kidney 2 (HK-2) proximális tubulus sejteket (LGC Standards, ATCC Cat# CRL-2190) vagy normál rat kidney fibroblasztokat (NRK-49F) (LGC Standards, ATCC Cat. No. CRL-1570, RRID:CVCL_2144) használtunk a molekuláris útvonalak feltérképezéséhez. A kezelési protokollokban alkalmazott dózisok, tenyésztési körülmények egyéb tényezők meghatározásához szükséges előkísérletek (dózis-hatásgörbe, toxicitás mérése) eredményeinek ismertetése meghaladja a dolgozat terjedelmi kereteit, így nem kerül bemutatásra.

Az *in vivo* kísérletek elkezdése előtt power analízissel meghatároztuk a minimálisan szükséges állatszámot. Kísérleteinket a Magyar Köztársaság állatvédelmi és állatkísérletekkel kapcsolatos törvényeinek (1998/XXVIII.) betartásával és a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelvei alapján, etikai engedélyek birtokában (PEI001/121/2007 PEI001/380/2013, PEI/001/1731-9/2015) hajtottuk végre.

IV.1. In vitro modellek

IV.1.1. Sejttenyésztés

Kísérleteinkben immortalizált human kidney 2 (HK-2) proximális tubulus sejteket (LGC Standards, ATCC Cat# CRL-2190) vagy patkány normál vese fibroblaszt (NRK-49F) sejteket (LGC Standards, ATCC Cat. No. CRL-1570) használtunk. Mindkét sejvonalat 5,5 mM glükózt tartalmazó Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM)-ben (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tenyésztettük, melyekhez 10% Fetal bovine serum (FBS)-t (GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin/sztreptomicin antibiotikum oldatot (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) és 1% L-glutamint (Sigma-Aldrich) adtunk. A sejteket 95%-os páratartalom, 5% CO₂ mellett, 37°C-os termosztátban tenyésztettünk. A sejtek passzálásához és mintagyűjtéshez 0.25% trypsin-EDTA-t (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) használtunk, és a kísérleteket a 2-12 passzázsok között végeztük el. A kezelések előtt a sejteket minden eseteben 24 órára szérummentes tápfolyadékba helyeztük és a kezelések is szérummentes közegben történtek (n = 6-8 lyuk/csoport minden kezelés esetében).

IV.1.2. Hiperglikémia in vitro modellezése

A hiperglikémia közvetlen hatásának vizsgálatára HK-2 és NRK49F sejteken 24 óra után a szérummentes tápfolyadékot lecseréltük (i) normál (5,5 mM), (ii) magas glükóz (35 mM) koncentrációjú, illetve (iii) ozmotikus kontrollként magas mannitol (5,5 mM glükóz + 29,5 mM mannitol) koncentrációjú tápfolyadékra további 24 óráig vagy 48 óráig. Az egyes kísérletsorozatokban különböző kezelési protokollokat használtunk, melyeket a *2. táblázat* foglal össze. A kontroll sejteket DMSO vivőanyaggal kezeltük (n = 6 lyuk/csoport). A hatóanyagokat, ahol nincs másképpen feltüntetve a Sigma Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) rendeltük. A hatékony dózisokat irodalmi adatok alapján határoztuk meg [197-199].

Kezelési csoport	Kezelési koncentráció
Kontroll	5,5 mM glükóz
HG	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 M glükóz + 10 μ M LOS + 10 μ M DAPA

2. táblázat Hiperglikémiás in vitro modell kezelési csoportjai (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)

IV.1.3. Fibrózis in vitro indukciója

NRK-49F sejteket vérlemezke eredetű növekedési faktorral (PDGFB) (10 ng/ml) vagy kötőszöveti növekedési faktorral (CTGF/CCN2) (10 ng/ml) kezeltük kombinálva a fenti RAASi-kal, ugyanazon dózisokat alkalmazva szérummentes tápfolyadékban 24 óráig.

IV.1.4. Hipoxia in vitro indukciója

A hipoxiát "*bold line stage top*" CO₂/O₂ hipoxiás kamrában indukáltuk (Okolab, Ottaviano, Olaszország), melyben a HK-2 sejteket 1% O₂ szint mellett tartottuk két órán át. A sejteket normál, 25 mM glükóz tartalmú médiumbantenyésztettük és (i) 10 μM DAPA (H + DAPA) (ii) 10 μM DAPA + 10 μM LOS kombinációval, iii) 10 nM 17β-ösztradiollal, (iv) 10 nM 17β-ösztradiollal + 3 μM

NE100 (Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság). 24 órán át kezeltük. A sejteket a 24 órás protokoll utolsó két órájában helyeztük a hipoxiás kamrába. Kontrollként normoxiás körülmények között tartott sejtek szolgáltak.

IV.1.5. Oxidatív stressz in vitro indukciója

Az oxidatív stressz hatását HK-2 sejteken hidrogén-peroxid (H₂O₂; 400 μ M) hozzáadásával vizsgáltuk, a reakciót 30 perc után állítottuk le, mivel az előkísérletek alapján ezt követően már szignifikáns sejtpusztulást detektáltunk. Az alábbi kezelési protokollokat használtuk: (i) 10 μ M fluvoxamin (FLU); (ii) FLU + 3 μ M N,N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoxi)-fenil]-etilamin monohidroklorid (NE100) (iii) FLU + 10 μ M AktVIII inhibitor (AktVIII; Santa Cruz Biotechnology, Budapest, Magyarország); (iv) FLU + 2 μ M AktIV inhibitor (AktIV; Santa Cruz Biotechnology, Budapest, Magyarország), (v) 10 nM 17 β -ösztradiollal, (vi) 10 nM 17 β -ösztradiollal + 3 μ M NE100 (Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság).

IV.2. In vivo modellek

IV.2.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinket beltenyésztett 6-8 hetes, 180-230 g súlyú, ivarérett, nőstény, illetve hím Wistar patkányokon végeztük (Toxi-Coop, Dunakeszi, Magyarország). Az állatokat ketrecenként hármasával, állandó hőmérséklet ($22 \pm 2^{\circ}$ C), 40-60% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk, standard rágcsálótápot és friss csapvizet *ad libitum* biztosítottunk.

IV.2.2. Streptozotocin-indukált diabétesz modell

T1DM típusú cukorbetegséget citrátban (0,1 M; pH=4,5) oldott, egyszeri, nagy dózisú streptozotocin (65 mg/ttkg, STZ, Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) intraperitoneális (*ip*.) adásával indukáltunk. A STZ injekció beadását követően 72 órával az állatok vércukorszintjét Dcont Trend stix-es vércukormérővel ellenőriztük (77 Elektronika Kft, Budapest, Magyarország). A patkányokat akkor tekintettük cukorbetegnek, ha három független mérés során a perifériás vér glükóz koncentrációja meghaladta a 15 mmol/l értéket. Ennél alacsonyabb vércukorszint esetén az állatokat kizártuk a további kísérletekből. A kezelések megkezdése előtt az állatokat vércukorértékeik alapján randomizáltuk, hogy minden kezelési csoport átlagos vércukorértéke közel azonos legyen (n=4-12/csoport, protokolltól függően, pontos szám az egyes kísérleteknél feltüntetve).

A korban illesztett, azonos testtömegű, kontroll állatok ekvivalens mennyiségű citrát puffert kaptak. A kezeléseket minden nap azonos időben, reggel 10:00-kor végeztük, a kezelések hossza és

menete, a viselkedési mintázatok vizsgálata, valamint az állatok és szervek feldolgozása mindegyik kísérlet során, azonos módon zajlott.

Tekintettel arra, hogy ezek az állatok inzulinkezelésben nem részesülnek a DM-re jellemző metabolikus elváltozások tünetei (fogyás, rossz általános állapot, sebek, szőrborzolás, glükozúria stb.) folyamatosan, felgyorsulva alakulnak ki. Az állatok állapotát naponta ellenőriztük és adatlapon rögzítettük: az állatok általános állapotát, mozgást, testtartást, szőr borzolást, bőr állapotát, légzést, táplálkozást, vizeletürítést *(16. ábra)*. Indokolt esetben, amennyiben bármely állat fizikai állapota számottevően romlott, az állatot elaltattuk.





Kiegészítő kísérletként a kezeléseket minden esetben elvégeztük kontroll, egészéges állatokon is. A gyógyszerek az egészséges állatok laboratóriumi paramétereiben, viselkedésében, illetve egyéb molekuláris vizsgálatokban semmilyen hatást nem eredményeztek, ezért a disszertációban ezek az eredmények nem kerülnek bemutatásra.

A RAASi dózisait korábbi vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján úgy választottuk, hogy antihipertenzív tulajdonságuktól függetlenül hatékonyan gátolják a RAAS egyes elemeinek expresszióját, illetve aktivitását [200-205]. A FLU hatékony dózisát előkísérletekben határoztuk meg. Humán gyógyászatban a FLU SSRI-ként történő alkalmazásakor (Fevarin, Luvox) a betegek 50-300 mg-os dózisban kapják tartósan, akár évekig a készítményt, így ez az adagolás figyelembe véve a patkány/ember testfelület konverziós számolásokat [206] (Patkány: 20 mg/ttkg / 6,2 = 3,22 mg/ttkg. Humán: 2,7-3,22 x 70 kg = 190 -225 mg) megfelel a terápiás dózistartománynak. A DAPA és az NE100 kezelési adagját irodalmi adatok alapján állítottuk be. A hatóanyagokat a Sigma Aldrich Kft-től szereztük be, kivétel NE100 (Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság). A kísérleti dózisokat a 3. *táblázat* fogalja össze.

Ebben a modellben 3. héttől jelennek meg a korai vesekárosodás jelei, 5 hetesen az állatok krónikus, 7 hetesen ESRD-ben szenvednek. Vizsgálataink során az állatokat több alkalommal 17-18

órára anyagcsere ketrecbe helyeztük vizeletgyűjtés céljából, mivel a fehérje, ill. cukorürítés gyűjtött vizeletből pontosabban meghatározható.

Kezelési csoport	Kezelési koncentráció	Időtartam
Egészséges kontroll	izotóniás sóoldat, mint vivőanyag	<u>6</u> ill. 7 hét
Diabétesz (D)	D + izotóniás sóoldat, mint vivőanyag	<u>6</u> ill. 7 hét
D + Enalapril	D + 40 mg/ttkg/nap ENA	2 hét
D + <u>Ramipril</u>	$D + 10 \ \mu g/ttkg/nap \ RAM$	2 hét
D+ Lozartán	D + 20 mg/ttkg/nap LOS	2 hét
D + Spironolakton	D + 50 mg/ttkg/nap SPI	2 hét
D + Eplerenon	D + 50 mg/ttkg/nap EPL	2 hét
D + Dapagliflozin	D + 1 mg/ttkg/nap DAPA	6 hét
D+ Dapagliflozin + Lozartán	D+1 mg/ttkg/nap DAPA+20 mg/ttkg/nap LOS	6 hét
D + Fluvoxamin-maleát	D + 20 mg/ttkg/nap FLU	2 hét
D + Fluvoxamin-maleát	D + 2 mg/ttkg/nap FLU	2 hét
D + Fluvoxamin-maleát +	D + 20 mg/ttkg/nap FLU + NE100	2 hét
NE1000		
D + <u>Fluvoxamin-maleát</u> + NE1000	D+ 2 mg/ttkg/nap FLU + NE100	2 hét

3. táblázat Streptozotocin-indukált diabéteszes modellben alkalmazott kezelési csoportok (ENA: enalapril, RAM: ramipril, LOZ: lozartán, SPI: spironolakton, EPL: eplerenon, FLU-fluvoxamin-maleát, NE100: N,N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoxi)-fenil]-etilamin monohidroklorid)

A kísérleti protokollok végén az állatokat 60 mg/ttkg ketamin (Richter Gedeon Nyrt. Budapest, Magyarország) és 5 mg/ttkg xylazin (Medicus Partner Kft. Biatorbágy, Magyarország) keverékkel elaltattuk és 4% wt/vol parafolmaldehiddel perfundáltuk. Az *a. abdominalisból* vért vettünk, a szervek (agy, tímusz, mellékvese, szív, vese) tömegét megmértük, a hippokampuszt és prefrontális régiót elválasztottuk, a vese kortex, medulla és pyelon rétegeit elkülönítettük. A szövetmintákat gyorsfagyasztást követően –80°C-on tároltuk, vagy 4% pufferolt formalinban (pH=7,4) fixáltuk. A különböző kísérletsorozatok kezelési protokolljait az alábbi *17. ábra* mutatja.



17. ábra A streptozotocin indukált diabéteszes állatmodellben alkalmazott protokollok STZ: streptozotocin, DM: Diabetes mellitus, RAAS: renin-angiotenzin aldoszteron rendszer, FLU: fluvoxamin, LOZ: lozartán, OFT: nyílt porond teszt (*open field test*), FST: erőltetett úszás teszt (*forced swim test*)

dc_1685_19 IV.2.3. Vese IRI patkánymodell

A műtéteket hím és nőstény Wistar patkányokon (200±15 g) pentobarbitál-nátrium (50 mg/ttkg; Nembutal, Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) vagy izoflurán (1,5 %; Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, Egyesült Királyság) anesztéziában végeztük.

Altatást követően rektális mért testhőmérséklet ellenőrzés mellett, hőmérséklet-szabályozott operációs padon medián laparatómiát végeztünk. A bal vesét ellátó artériát és vénát kipreparáltuk, majd 50 percre leszorítottuk. Az iszkémiás periódus lejárta előtt az ellenoldali vesét eltávolítottuk. A fogó felengedését követően a reperfúzió sikerességét a vese színváltozásának követésével ellenőriztük, majd a hasfalat és a bőrt véglegesen zártuk, végül az állatokat a teljes éberség visszanyerését követően ketreceikbe helyeztük. Kontrollként áloperált állatok szolgáltak (n = 6-12/csoport) kezelési protokolltól függően.

A kísérletek végén (2 (T2), illetve 24 órával (T24) az IRI-t követően) az állatokat terminálisan 60 mg/ttkg ketamin (Richter Gedeon Nyrt. Budapest, Magyarország) és 5 mg/ttkg xylazin (Medicus Partner Kft. Biatorbágy, Magyarország) keverékkel elaltattuk. Az *a. abdominalisból* vettünk vért, a vesét begyűjtöttük, megmértük, majd a kortex, medulla és pyelon rétegeit elkülönítettük. A szövetmintákat szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően –80°C-on tároltuk, vagy 4% pufferolt formalinban (pH=7,4) fixáltuk a további vizsgálatokig.

A nemi hormonok vizsgálatát hím és nőstény, illetve ovariektomizált (OVX) állatok csoportjain végeztük. Ehhez az OVX-t a nemzetközi gyakorlatnak és saját tapasztalatainknak megfelelően 7 nappal az iszkémiás inzultus előtt végeztük el medián laparotómiából, általános érzéstelenítésben [207], így biztosítva az állat felépülését és ösztrogén szintjének biztos lecsökkenését. Mivel az irodalmi adatok szerint az OVX után 1 héttel az állatok szérum 17β-ösztradiol szintje detektálási határ alatt van, szérum hormonszint méréseket nem végeztünk.

A S1R agonista FLU hatását másik kísérletsorozatban vizsgáltuk. A FLU dózisát előkísérletekben határoztuk meg a vesefunkció (kreatinin, urea nitrogén (BUN)) és a tubulus károsodás hisztológiai értékelésével. A 2 mg/ttkg-os dózis a tubulusok károsodásának kivédésében még nem bizonyult elég hatásosnak, a 40 mg/ttkg-os dózis pedig már nem javította tovább a hatást, így a 20 mg/ttkg-os dózist alkalmaztuk.



18. ábra Iszkémia/reperfúziós károsodás műtéti modelljének lépései és az alkalmazott protokollok (a) bal oldalon az ép jobb vese (j) jobbra a klippel (k) lezárt hilusú, elhalványodott bal vese (b); (b) 50 perc iszkémia elteltével a bal vese sötét színű; (c) a jobb vese eltávolítása és a klip levétele után jól látható a bal vese reperfúziója, melyet élénk színe mutat. Kísérlet során készült saját felvételek (Dr. Hosszú Ádám, Dr. Antal Zsuzsanna).

IV.2.4. Vese izograft autotranszplantációs patkánymodell

A műtétet HUND Wetzlar SM33 operációs mikroszkóppal a fent ismertetett anesztéziában hőmérséklet-szabályozott operációs padon végeztük. Medián laparatómiából az a. és v.renalist és az uréter kipreparálása után a vesét az artériába helyezett kanülön keresztül 0°C-os Custodiol HTK prezervációs oldattal vagy Custodiol + 10 µM fluvoxamin, vagy Custodiol + 10 µM SA-4503 (Dr. Franz Kohler Chemie Gmbh., Bensheim, Németország) átmostuk, míg a vese teljesen elhalványult.

Az eltávolított vesét eltávolítottuk, két órán át, ugyanebben az oldatban 4°C-on tároltuk (*CIT*) majd visszahelyeztük az állatba, a renális ereket vég-a-véghez anasztomózissal összevarrva. A klipek felengedésével ellenőriztük a reperfúziót. A *meleg iszkémiás* idő mindig 35 perc volt. Az urétert is összevarrtuk és eltávolítottuk az ellenoldali vesét. A hasfalat és a bőrt zártuk, végül az állatokat a teljes éberség visszanyerését követően ketreceikbe helyeztük. Kontrollként áloperált állatok szolgáltak (n = 6/csoport). Az állatokat 24 órával (T24) a reperfúziót követően leöltük, a mintavétel az IRI modellben ismertetettek szerint zajlott.



19. ábra Vesetranszplantáció műtéti modelljének lépései és az alkalmazott protokoll (a) A hideg iszkémiás idő leteltével a vese visszahelyezése az állatba. Láthatók a szeparáltan leszorított artéria (a) és véna (v) csonkok, valamint az átvágott ureter (u), (b) A véna anasztomózis varrása: a csonkvégek fent és lent egy-egy varrattal összeöltve, kifeszítve, (c) Az artéria anasztomózis varrása: csomós öltések. (d) Az anasztomózisok megvarrása után a klipek eltávolítása. Kísérlet során készült saját felvétel (Dr. Hosszú Ádám, Dr, Antal Zsuzsanna)

Kontralaterális nefrektómia

IV.2.5. Vese hideg iszkémiás patkánymodell

A hideg iszkémia miatt kialakuló károsodás vizsgálatára külön modellt alkalmaztunk. Anesztéziát követően a vesét az artériába helyezett kanülön keresztül 0°C-os Custodiol HTK vagy Custodiol + 10 μM FLU, Custodiol + 10 μM SA-4503 vagy Custodiol + 10 μM PRE084 tartalmú prezervációs oldattal (Dr. Franz Kohler Chemie Gmbh., Bensheim, Németország) átmostuk, majd 2 vagy 3 vagy 8 vagy 24 órára ugyanebben az oldatban jégre helyeztük. A hideg iszkémiás periódust követően a vesemintákat a korábbiak szerint feldolgoztuk.

Vese begyűjtése

dc_1685_19 IV.3. In vivo funkcionális vizsgálatok

IV.3.1. Képalkotó vizsgálatok

IV.3.1.1. Két-foton mikroszkópos mérések

A két-foton mikroszkópos mérésekhez a Femto 2D High Sensitivity Galvanoscanner-Based Two-Photon Microscope (Femtonics Kft., Budapest, Magyarország) konfokális, lézerpásztázó fluoreszcens rendszert használtuk. Pentobarbitál-nátrium anesztéziában (50 mg/ttkg; Nembutal, Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) a vesét egy 1-2 cm-es dorzális bemetszésen át kiemeltük. Az *a. carotisba* adott 70 kDa Rodamin Dextrán festi az ereket, a Texas Red az ép kefeszegélyt jelöli, Hoechst 33342- vel kékeka sejtmagok (flurofórok: LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA). A tubulusok autofluoreszcenciájukból adódóan zöldek *(20. ábra)*. Elemeztük az intakt kefeszegély jelenlétét, a sejtmagok integritását, és a tubulusok lumenében felhalmozódó nekrotikus szövettörmelék előfordulását. A pertibuláris kapillárisok átmérőjének változását egy 30 perces periódusban követtük nyomon, a folyamatos mérés során percenként készítettünk képet ugyanarról a látótérről, majd ugyanazokat az ereket mértük le. Az 1., 10., 20. és 30. percben mért érátmérők közti különbséget kvantifikáltuk. Állatonként kb. 150 kapillárist mértünk le. A képeket Matlab (Femtonics Kft, Budapest, Magyarország) és Image J (The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) szoftverek segítsegével értékeltük ki *(20. ábra)*.



20. ábra Két-foton mikroszkópos felvétel Az állat a két-foton mikroszkópban, (B) peritubuláris kapillárisok érátmérőjének mérése (C) Tubulus képe Piros: vesekapillárisok, kék: sejtmag zöld: autofluoreszcencia, lépték: 200 μm. Kísérlet során készült saját felvétel (Dr. Hosszú Ádám)

dc_1685_19 <u>IV.3.1.2. SPECT- MRI</u>

Az agyi perfúzió és mikroglia aktiváció egyidejű vizsgálatára Single Photon Emission Computed Tomography-Magnetic Resonance Imaging (SPECT-MRI) képalkotó eljárást alkalmaztunk a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézettel Kooperációban. A méréseket Dr. Máthé Domokos és Dr. Szigeti Krisztián végezte. A vizsgálat során az állatokat izoflurán-oxigén elegyével végig altatásban tartottuk (amíg el nem aludt az állat 3,5-4% izofluránt alkalmaztunk, majd ezt lecsökkentettük 1,5%-ra a képalkotás idejére). A mérések előtt 14 mg/ttkg kálium-perklorátot (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ip. injektáltunk az állatokba, hogy elkerüljük pajzsmirigy szabad [125I]-iodine felvételét. Az állatoknak először 9.35 ± 2.00 MBq 125I-jelölt 6-kloro-2-(4'iodofenil)-3-(N,N-mmetiletil)imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamie ([125I]CLINME) radioaktív Budapest, izotópot adtunk (Progressio, Magyarország), majd 30 perccel később 135.86 ± 6.84 MBq 99mTc-jelölt hexametil-propilénamin. oxim ([99mTc]HMPAO) (Medi-Radiopharma, Érd, Magyarország) izotópot juttatunk be. A [99mTc]HMPAO injektálása után végeztük el az MRI mérést nanoScan 1T MRI rendszerrel (Mediso, Budapest, Magyarország), mely során T1-súlyozású GRE 3D szekvenciát alkalmaztunk (460 µm in-plane felbontás, metszet vastagság 500 µm, TR/TE 1262 ms, TD 20 µs és négy excitátiós eredmény egy 9,5 perces mérésnél).

A SPECT-CT méréseket NanoSPECTCT PLUS gépen (Mediso, Budapest, Magyarország) végeztük el, és az eredmények kiértékelését a MBq/ml-ben mért rádioaktivitás egységeként (0,33 mm, izovoxel) határoztuk meg. Az MRI mérések során egy atlasz-alapú módszert alkalmaztunk az egyes agyi régiók (kamrák, kisagy, kortex, hippokampusz, striátum, bulbus olfactorius) és az egyes kiválasztott kisebb területek (VOI) vizsgálatára.

A [99mTc]HMPAO jelölés során mértük az egyes agyi szegmensek standardizált felvétel értékeit (SUV). A [125I]CLINME jelölés esetében meghatároztuk a szövetben mért aktivitás és az artériás vérben mért aktivitás arányát a vizsgált kiválasztott agyi szegmenseknél. Ehhez a kép-alapú artériás vérben mért aktivitási koncentrációt vettük alapul. A kapott adatokat a saját régióban mért [99mTc]HMPAO SUV értékekre normalizáltuk. A 3D SPECT VOI képeinek elemzését VivoQuant 1.22 patch2 szoftverrel (InviCRO, Boston, MA, USA) végeztük.

IV.3.2. Vérnyomás- és pulzusmérés

Az állatok artériás vérnyomását és pulzusát CODA Standard tail-cuff monitoring[™] (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) módszerrel mértük 37°C-os melegítőpárnán 3% izoflurán és szintetikus levegőelegy (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, Egyesült Királyság) belélegeztetésével végzett altatásban. A vérnyomás és pulzusmérésre alkalmas gyűrűs mandzsettákkal mértük a szisztolés és a diasztolés vérnyomást, valamint a pulzust. Az artériás

középnyomás értékét a szisztolés és diasztolés értékekből számoltuk ki. Minden állatnál több alkalommal, legalább 3 mérést végeztünk. A tail-cuff monitoring rendszer előnye, hogy nem invazív, így kisebb megterhelést jelent az állatoknak, emellett pontossága közel 95%-ban egyezik a gold standardként használt telemetriás eljárással.

IV.3.3. Viselkedési tesztek

A depresszió tanulmányozására akut és krónikus állatmodellek is rendelkezésre állnak. Mivel a stressz a depressziós epizódok kialakulásának fontos kiváltó tényezője, a depresszió állatmodelljeiben főként krónikus enyhe stressz (nedves alom, megbillent ketrec), szociális stressz vagy farmakológiai szerek révén idézik elő a depresszió-szerű viselkedést [208]. Az akut modelleket leginkább az új antidepresszáns gyógyszerek tesztelésére fejlesztették ki, ahol sokszor stresszhatás nélkül vagy akut stressz kiváltását követően vizsgálják a gyógyszerekre adott mozgásmintázat változásokat. A depresszió neurobiológiai elváltozásainak tanulmányozását krónikus stressznek kitett állatokon vizsgálják, mely alkalmas a kialakuló központi idegrendszeri strukturális elváltozások feltárására is. Ilyen krónikus stresszállapot okozta depresszió alakul ki DM hosszútávú fennállása során is, bár a cukorbetegség nem klasszikus modellje a depressziónak.

A depresszió komplex viselkedésmintázat, tanulmányozására többféle tesztet kifejlesztettek, melyek mindegyike a depresszió egy-egy jellegzetes tünetének megfigyelésére alkalmas. DM-ben egyes tesztek használhatósága limitált, hiszen pl. az egyik legelterjedtebb viselkedési teszt a cukor preferencia teszt – melyben az anhedónia jelenségét pozitív megerősítésre, jutalomra csökkent válasszal modellezik – cukorbeteg állatokban nem használható. Az STZ-indukált T1DM patkánymodellben a depresszió megállapítására leginkább alkalmazott viselkedési teszt a Porsolt-féle erőltetett úszás teszt [209]; vizsgálataink során mi is ezt használtuk.

IV.3.3.1. Erőltetett úszás teszt

A magatartásteszteket erre a célra elkülönített, gyengén megvilágított (15W), 21°C hőmérsékletű szobában végeztük. Az állatokat randomizáltuk, mivel a nagy elemszám miatt nem volt lehetőség az összes állat egy napon történő vizsgálatára. A méréseket minden nap ugyanabban az időpontban végeztük, minimálisra csökkentve a környezeti változók variabilitásának hatását.

A Porsolt-féle erőltetett úszás teszt során az állatokat $24 \pm 1^{\circ}$ C-os csapvízzel feltöltött üveghengerekbe (átmérő: 30 cm; magasság: 60 cm, vízszint: 40 cm) tettük. Az előzetes tesztnél 15 percig, a teszt periódusban pedig 5 percig Sony DCR-SX21E digitális videokamerával rögzítettük a viselkedésüket. A hengereket minden vizsgálat után kiöblítettük és friss vízzel töltöttük fel (*21. ábra*).

Elemzéskor két független vizsgáló vakon értékelte ki a négyféle viselkedési paraméter időszázalékát a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet által fejlesztett és validált *H77* szoftverrel. Viselkedési paraméterek: *lebegés* (az állat nem mozog azon kívül, ami szükséges a fej vízszint fölött tartásához), *kapálózás* (az állat erőteljes végtagmozgások, a mellső végtagok megtörik a vízfelszínt és kaparó-szerű mozgást végeznek a henger falán), *úszás* (koordinált, aktív helyváltoztató mozgás, mely során a végtagok nem törik meg a vízfelszínt), illetve *búvárkodás* (az állat egész testével lebukik a vízfelszín alá) [210]. Az adatok kiértékeléskor a mozgásformákat két nagyobb csoportra osztottuk, ahol a kapálózás, úszás és búvárkodás időszázalékának összege a mobilitási, míg a lebegés ideje az immobilitási paramétert jellemzi *(11. ábra)*.



21. ábra Erőltetett úszás teszt Kísérlet során készült saját felvétel (Dr. Lénárt Lilla)

IV.3.3.2. Porond teszt

A porond teszt a legelterjedtebb módszer a laboratóriumi rágcsálók lokomotoros aktivitásának és felderítő magatartásának meghatározására [211]. A vizsgálatokat egy 100 x 100 x 60 cm-es, átlátszó plexilapokkal körülvett dobozban végeztük, melynek alja 10 x 10 cm-es négyzetekre van osztva. A patkányokat középre tettük és 10 percen át videóra rögzítettük a viselkedésüket. Az elemzés során a vonal átlépések számát határoztuk meg. *(22. ábra)*.



22. ábra Porond teszt Kísérlet során készült saját felvétel (Dr. Lénárt Lilla)

dc_1685_19 IV.4. Szérumból, vizeletből laboratóriumi végzett mérések

IV.4.1. Fotometriás mérések

Az állatok leölésekor vett vérből szérumot izoláltunk (6 min centrifugálás, 3600 rpm). Fotometriás módszerrel (Roche Hitachi -712, Basel, Svájc) meghatároztuk a szérum glükóz, fruktózamin, kreatinin, BUN, nátrium, kálium, klorid, albumin, összfehérje, triglicerid, összkoleszterin és magas denzitású lipoprotein (HDL) koleszterin, glutamát-oxálacetátaminotranszferáz (GOT) és glutamát-piruvát-transzamináz (GPT) értékeket. Az alacsony denzitású lipoprotein (LDL)-koleszterin számítására a Friedewald képletet használtuk: LDL-koleszterin = összkoleszterin -(HDL-koleszterin + triglicerid/2,2). A 24 órás gyűjtött vizeletet 3600 rpm fokozaton, 6 percig centrifugáltuk, majd kreatinin, BUN, fehérje és glükóz mennyiségi meghatározást végeztünk. A szérum és vizelet kreatinin értékekből testsúlyra vonatkoztatott kreatinin-clearencet számoltunk a következő képlettel: (vizelet kreatinin x vizeletmennyiség / szérum kreatinin) / vizeletgyűjtési idő percenként / állat súlya x 100. A vizeletüledéket mikroszkóposan vizsgáltuk, illetve próbaleoltásokat végeztünk az esetleges infekció kizárására. A kreatinin clearance értékét vizelet kreatinin x vizeletmennyiség / szérum kreatinin) / vizeletgyűjtési idő percenként / állat súlya x 100 képlettel becsültük.

IV.4.2. ELISA mérések

A szérum BDNF és a gyűjtött vizeletből mikroalbuminúria, KIM-1 és NGAL koncentrációját szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg (R&D System, Minneapolis, MN, USA). A kísérletet szobahőmérsékleten végeztük és az egyes lépések között háromszor mostuk a platet. A 96-lyukú platet előszőr az elsődleges antitesttel 24 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a BDNF, KIM-1 és NGAL esetében 1% BSA-PBS-sel, az albumin mérésénél 1% BSA-TBS-sel 1 óráig blokkoltuk. A mintákat duplikátumban alkalmaztuk és a blokkoló oldatban BDNF-nél 1:10; albuminnál 1:1000, NGAL-nál 1:100 arányban hígítottuk, majd 2 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően, hozzáadtuk a megfelelő másodlagos biotinilált antitesteket. Két órás inkubációt követően a mintákra sztreptavidintormaperoxidáz konjugátumot mértünk. 20 perces inkubációt követően hozzáadtuk a szubsztrátként alkalmazott tetrametil-benzidint, mely során a peroxidáz aktivitás eredményeként kék színreakciót tapasztatunk. Öt perc elteltével leállítottuk a reakciót 2N H₂SO₄ oldattal. A minták optikai denzitását spektrofotométerrel (Chameleon V Florometer-Luminometer Photom, Hidex, Turku, Finnország) 450 nm hullámhosszon detektáltuk. Az ismert koncentrációjú standard abszorbancia értékéből kapott görbe alapján kiszámítottuk a relatív koncentrációkat.

A renális fibrotikus folyamat biomarkereiként használható uC3M, rPRO-C3, TUM, FBN és PRO-C4 meghatározásához a Nordic Bioscience (Herlev, Dánia) saját fejlesztésű kitjét használtuk

kooperációban. A kit humán használatra engedélyeztetés alatt van az FDA-nél, így a mérések referenciamérésként a kooperációs partner Dr. Federica Genovese Nordic Bioscience, Dánia laboratóriumában történtek vizeletből és HK-2 ill. NRK-49F sejtek felülúszójából.

IV.5. Hisztológiai vizsgálatok

A hagyományos hisztológiai vizsgálatokhoz a vesék középső részét 4%-os formalin fixálást követően paraffinba ágyaztuk, majd 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteken perjódsav Schiff (PAS), hematoxilin-eozin, Masson-féle trichrome és PicroSirius Red festést végeztünk. A megfestett metszeteket digitális metszet szkennelő automatával (Panoramic 250 Flash 3, 3D Histech Kft, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk, kiértékelésüket kódolva, két egymástól független vizsgáló végezte.

IV.5.1. Hematoiylin-eozin festés

A hematoxilin- eozin (HE) festést referenciaeljárásként használtuk a szöveti struktúra épségének ellenőrzésére, mert jól festődnek a sejtmagvak (kékeslila), a citoplazma az eozintól piros színű lesz.

IV.5.2. Perjódsav-Schiff festés

A Perjódsav-Schiff (PAS) festett metszeteken többféle kiértékelést végeztünk.

(i) *DKD*: A mezangiális mátrix expanzió mértékét vizsgáltuk a DM modellben, mert a mezangiális mátrix, mely a glomerulus belsejében található erősen PAS-pozitív szövet felszaporodása a DKD kialakulására utal [212]. Állatonként 15 db 400x nagyítású digitális metszeten *Scion image* (Scion Corporation, http://scion-image.software.informer.com/) szoftverrel értékeltünk.

(ii) Az IRI okozta károsodás: értékelését korábbiakban is már használt pontskála [182, 207] alapján végeztük. A glomeruláris károsodást a hipercellularitás és a kollapszus mértéke alapján határoztuk meg 0-3-ig terjedő skálán, ahol 0-nincs, 1 - enyhe (a sejtek <30%-ában), 2 - közepes (a sejtek 30-60%-ában), 3 - súlyos (a sejtek több mint 60%-ában) hipercellularitás/kacslumen kollapszus látható. A tubuláris károsodás mértékét az epitélium károsodás – a PAS metszeten rózsaszínnel festődő kefeszegély eltűnése, a hámban és a tubulusban lévő hialin mennyisége alapján írtuk le. Az epitélium károsodás fokát 0-4-ig minősítettük a következők szerint: 0-nincs károsodás, 1 - tubulus sejt duzzadás, vakuolizáció, kefeszegély eltűnés, 2 - tubulus sejt nekrózis <1/3 arányban, 3 - tubulus sejt nekrózis 1/3-2/3 arányban, 4 - tubulus sejt nekrózis több mint 2/3 arányban. A hámban és a tubulusban található hialin mennyisége: 0 - nincs, 1 - kevés, 2 - sok. Az IRI-ben szerepet játszó inflammációs folyamatok súlyosságát a leukocita infiltráció értékelésével határoztuk meg: 0 - nincs

infiltráció, 1 - kevesebb mint 10 infiltráló sejt/ látótér, 2 - 11-50 infiltráló sejt/ látótér, 3 - 51-100 infiltráló s sejt/ látótér, 4 - több mint 101 infiltráló sejt/ látótér.

(iii) KTx mintáinak értékeléséhez a tubulus károsodásakor észlelhető tubuláris lumen kitágulását értékeltük [213], melyet az epitél sejtek nekrózisa és degradációja, valamint a sérült víz visszaszívás miatt a lumenbe jutó nagyobb mennyiségű folyadék és törmelék okoz. Állatonként 6 látótérben 20-20 tubulus lumen területét mértük le Adobe Photoshop szoftver (Adobe Systems, San José, USA) használatával, az állatonként mért össz-terület nagyságát μm2-ben adtuk meg. A nagyobb lumen terület súlyosabb károsodást jelez.

IV.5.3. Masson-féle trichrome festés

A kollagénben dús kötőszövet felhalmozódást Masson-trichrome eljárással vizsgáltuk, mely a citoplazmát és a vörösvértesteket vörösesre, a sejtmagokat feketére, az ECM alkotórészeket (kollagént, fibrint, simaizom-aktint) kékre festi. Vesénként 200x nagyítással 10 képet értékeltünk, mind a kéregből, mind a velőállományból (kizárva a glomerulusokat és a nagyobb ereket). A tubulointerstíciális fibrózis mértékére a kék szín mennyiségéből következtettünk, *Scion Image* szoftverrel végeztük az értékelést.

IV.5.4. Sirius-red festés

A Sirius-red festés a kollagén I, II és III-at pirossal [214], a sejtmagot és a citoplazmát sárgán festi. A fibrotikus terület kvantifikálására minden állat veséjéről egyenként tíz, 100x nagyítású területen felvételt készítettünk, a piros színű terület százalékos arányát *Scion Image* szoftverrel kiszámítottuk, ebből következtettünk a felszaporodó kollagén mennyiségére.

IV.6. Immunhisztokémia

IV.6.1. Agy immunhisztokémiai festés

Agyszövet szabadon-úszó 25 µm vastagságú, szagitális metszeteit 67°C-on történő epitópfeltárást követően, vagy 5-10% szamár szérummal történő blokkolás után a megfelelő elsődleges antitestekkel (*4. táblázat*) (4°C, overnight) inkubáltuk. Mosásokat követően a megjelenítéshez másodlagos anti-AlexaFluor 488, 647, vagy 594 antitesteket (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA USA) használtunk. A metszeteket Ni-E C2+ (Nikon, Tokió, Japán) konfokális mikroszkóppal, a képfeldolgozást NIKON NIS Elements Viewer 4.20 (Auroscience, Budapest, Magyarország) szoftverrel végeztük. Minden metszetből három random kiválasztott látóteret értékeltünk, Dr. Dénes Ádám Lendület munkacsoportjával együttműködve a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben.

IV.6.2. Vese immunhisztokémiai festés

A xilolban deparaffinizált 2-5 μm vastag metszeteket rehidratáltuk, majd 93°C-on tártuk fel az epitópokat (Hisztopatológia Kft, Pécs, Magyarország). A nem specifikus kötődéseket BSA-val blokkoltuk. A elsődleges antitestekkel (*4. táblázat*) inkubáltunk (4°C, overnight), mosások után hozzáadtuk a BiotinylatedLink másodlagos antitesteket (DakoCytomation, Glostrup, Dánia) (15 min, szobahő). A megjelenítés standard avidin-biotin peroxidázzal (ABC system, DakoCytomation, Glostrup, Dánia) történt, majd a metszeteket HE-nal kontrasztfestettük és Zeiss AxioImager A1 light microscope (Zeiss, Jena, Németország) fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

A másodlagos fluoreszcens jelöléshez anti-AlexaFluor 488, 594, 647, antitesteket használtunk. A vizualizálát Carl Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézermikroszkóppal (Carl Zeiss Gmbh., Jéna, Németország) 200x-os és 630x-os nagyításson, a kiértékelést QuPath szoftverrel (Cell Biology, Queen's University, Belfast, Egyesült Királyság) végeztük.

Célfehérje	Gyártó	Kat.szám	Faj	Hígítás
αSMA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	A2547	egér-monoklonális	1:100
Aquaporin2	Santa Cruz BiotechnologySanta Cruz, CA, USA	sc-9882	kecske- poliklonális	1:50
BDNF	Abcam, Cambridge, MA, USA	108319	nyúl-monoklonális	1:500
Fibronektin	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab2413	nyúl- poliklonális	1:100
GFAP	Synaptic Systems, Göttingen, Németország	173006	csirke-poliklonális	1:500
GGT1/2	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	sc-23823	kecske- poliklonális	1:50
GRP94	Invitrogen, Carlsbad, California, USA	MA3-016	patkány- monoklonális	1:250
HIF-1a	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab2185	nyúl - poliklonális	1:50
HSF-1	Novus, Cambridge, Egyesült Királyság	NBP1-97475	nyúl - poliklonális	1:100
ICAM-1	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	AF796	egér - poliklonális	1:500
IL-1α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	AF-400-NA	kecske-poliklonális	1:500
Na+/K+ ATP-áz	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	sc-21712	egér- monoklonális	1:100
NHE3	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	MAB3136	egér-monoklonális	1:50
P2Y12	AnaSpec, Fermont, CA, USA	55043A	nyúl-poliklonális	1:500
p-CREB	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	87G3	kecske-monoklonális	1:500
PDGFR-β	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-432	nyúl-poliklonális	1:100
PGP9.5	Abcam, Cambridge, MA, USA	72910	csirke-poliklonális	1:500
S1R	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	137075	egér-monoklonális	1:50
S1R	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	423300	nyúl-poliklonális	1:50
SGLT1	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab14686	nyúl-poliklonális	1:50
SGLT2	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab37296	nyúl-poliklonális	1:50
Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	703-546-155	kecske-poliklonális	1:200
Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA USA	A11058	kecske-poliklonális	1:200
Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire,	715-605-150	kecske-poliklonális	1:500
Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA USA	A-11036	kecske- poliklonális	1:200
Alexa Fluor 546 phalloidin	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA USA	A22283	-	1:40
bisBenzimide H trihydrochloride	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	B2261	-	1:1000

4. táblázat Immunhisztokémiai festéshez használt antitestek

dc_1685_19 IV.6.3. TUNEL próba

8%-os formalinban fixált, paraffinba ágyazott patkányvesékből 5 μm-es metszeteket készítettünk. Paraffin mentesítést követően az Apoptag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kitet (Millipore, Billerica, MA, USA) használtunk. A minták 15 perces Proteináz K előkezelését majd mosásokat követően az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os H₂O₂ – metanol eleggyel blokkoltuk (5 min, szobahő), majd 30% TdT enzimet tartalmazó reakció pufferben 1 órán át, végül a reakciót leállítottuk. A tárgylemezeket ezután 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten anti-Dioxigenin Conjugate reagenssel, majd DAB peroxidáz szubsztrátot adtunk hozzá. A TUNEL próba pozitivitása a kortexben, valamint a kortikomedulláris régióban detektált pozitív sejt százalék szoftveres meghatározása alapján történt. A kiértékelést QuPath-szal végeztük.

IV.7. Molekuláris biológiai módszerek

IV.7.1. RNS izolálás és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció

Az eltávolított szervek azonos tömegű szövetminta darabjából vagy a sejtszuszpenzióból totál RNSt izoláltunk Total RNA Mini Kit-tel (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Thaiföld). Az RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (BCM, Huston, TX, USA) állapítottuk meg. Mintánként 500 ng RNS-ből komplementer DNS-t szintetizáltunk Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kittel.

A valós idejű PCR méréseket Light Cycler 480 SYBR Green I Master enzyme mix (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bázel, Svájc) reagensekkel LightCycler 480 (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bázel, Svájc) gépen végeztük. Az egyes génekre specifikus forward és reverse primereket terveztünk az NCBI nukleotid adatbázisban található szekvenciák alapján (*5. táblázat*). A primereket az Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA) cég szállította. A PCR reakcióhoz 20 µl végtérfogatban 10 µl LightCycler 480 SYBR Green Master enzyme mix, 1 µl cDNS, 7 µl nukleináz-mentes vizet és az adott célfehérjére specifikus 1-1 µl forward és reverse PCR primert tartalmazó elegyet használtunk. A különböző célfehérjék mRNS expresszióját a 18s riboszómális RNS (*Rn18s*) háztartási gén arányában határoztuk meg az $x= 2-\Delta$ Cp képlet alapján.

Gén neve	NCBI azonosító	Primer szekvencia	Termék hossz (bp)
CCN2	NM 0019013	Forward: 5' GTCCACCCGGGTTACCAATGACAA 3'	136
00112	1001-001001.0	Reverse: 5' CAGGATCGGCCGTCGGTACATACT 3'	
RNA18SN5	NR 0032864	Forward: 5' GGCGGCGACGACCCATTC 3'	136
10,11100115	144_005200.1	Reverse: 5' TGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGG 3'	150
PDGFB	NM 0026084	Forward: 5' AGATGGGGCCGAGTTGGACCTGAA 3'	163
TEGIE	1414_002000.4	Reverse: 5' GCGCCGGGAGATCTCGAACACCT 3'	105
TGFB1	NM 0006607	Forward: 5' GCGTGCGGCAGCTGTACATTGACT 3'	174
101.51	1442_000000.7	Reverse: 5' CGAAGGCGCCCGGGTTATGC 3'	
Bax	NM 0170592	Forward: 5' AGCCGCCCAGGACGCATCCA 3'	299
	1111_0170357.2	Reverse: 5' CAGCCGCTCCCGGAGGAAGTCCAG 3'	
Bel2	NM 0169931	Forward: 5' ATGGCGCAAGCCGGGAGAACAG 3'	232
	1111_010555.1	Reverse: 5' TGGCGACAAGGGGCCGTAGAGG 3'	
Behnf	NM 0012706301	Forward: 5' CGGCCCAACGAAGAAAACCATAAG 3'	157
2.00		Reverse: 5' AGTGGCGCCGAACCCTCATAGA 3'	0.000
Ce12	NM 0315301	Forward: 5' ATGCAGTTAATGCCCCACTC 3'	167
0012	1441_051550.1	Reverse: 5' TTCCTTATTGGGGTCAGCAC 3'	107
Cen2	NM 022266.2	Forward: 5' TCCACCCGGGTTACCAATGACAATAC 3'	195
con	1441_022200.2	Reverse: 5' CTTAGCCCGGTAGGTCTTCACACTGG 3'	
Eno	NM 0170011	Forward: 5' ATGAAGGTGGAAGAACAGGCT 3'	173
Dpo	1441_017001.1	Reverse: 5' ACCCGAAGCAGTGAAGTGAG 3'	115
Gandh	NM 017008.4	Forward: 5' CACCACCATGGAGAAGGCTG 3'	159
oupun	1442_017000.4	Reverse: 5' GTCATGGCATGGACTGTG 3'	155
Howerl	NM 173149.2	Forward: 5' CGCAGAGAAACCCGACTAAG 3'	194
1100071	14141_175145.2	Reverse: 5' CAAAGCTCAGAGAGCCCATC 3'	1.74
Hifla	NM 0243591	Forward: 5' AAGAAACCGCTTATGACGTG 3'	170
ingia	1441_0240000.1	Reverse: 5' CCACCTCTTTTTGCAAGCAT 3'	1/0
Henala	NM 031971.2	Forward: 5' GGCTGAGAAAGAGGAGTTCG 3'	216
mpura	1441_051571.2	Reverse: 5' CCACCCATCTGTCTCCTAGA 3'	210
Henhl	NM 0319704	Forward: 5' GAAATACACGCTCCCTCCAG 3'	119
inper		Reverse: 5' TGATCTCCGCTGATTGTGTG 3'	
Illa	NM 0170191	Forward: 5' TCTGCCATTGACCATCTGTCTCTG 3'	152
	1441_017012.1	Reverse: 5' ACCACCCGGCTCTCCTTGAA 3'	
IIIh	NM 031512.2	Forward: 5' TGGGCCTCAAGGGGAAGAA 3'	177
	1441_051512.2	Reverse: 5' TGGGGAACTGTGCAGACTCAAA 3'	117
116	NM 012589.2	Forward: 5' GCCACTGCCTTCCCTACTTC 3'	153
	100 C	Reverse: 5' GCCATTGCACAACTCTTTTCTC 3'	
Lcn2	NM 130741.1	Forward: 5' CAAGTGGCCGACACTGACTA 3'	194
		Reverse: 5' GGTGGGAACAGAGAAAACGA 3'	
Mmp2	NM 031054.2	Forward: 5' TCCCCCAAAACAGACAAAGAGT 3'	224
		Reverse: 5' TTGCGGGGAAAGAAGTTGTAGT 3'	1.1.1
Pdefb	NM 031524.1	Forward: 5' TCGATCGCACCAATGCCAACTTCC 3'	236
		Reverse: 5' CACGGGCCGAGGGGTCACTACTGT 3'	800.00
Rn18s	NM 001025002.1	Forward: 5' GCGGTCGGCGTCCCCCAACITCIT 3'	105
Search and		Reverse: 5' GCGCGTGCAGCCCCGGACATCTA 3'	1960/1994
Sigmar1	NM 030996.1	Forward: 5' GAGTATGGCCGGGGGGTGTTATTCC 3'	104
		Reverse: 5' TAGGCGCGAAGGGTATAGAAGAGG 3'	
Tefbl	NM 021578.2	Forward: 5' GCACCGGAGAGCCCTGGATACC 3'	222
	5.0	Reverse: 5' CCCGGGTTGTGTGTGGTTGTAGAGG 3'	
Timpl	NM 053819.1	Forward: 5' GGCGCCCTTTGCATCTCTGG 3'	250
	100	Reverse: 5' GGCGAACCGGAAACCTGTGG 3'	
Timp2	NM 021989.2	Forward: 5' GCCCIGGGACACGCTTAGCATC 3'	220
		Keverse: 5' GTACCACGCGCAAGAACCATCACT 3'	
Tlr2	NM 198769.2	Forward: 5' GCTAGGTAAAGTAGAAACGGTAAC 3'	110
		Reverse: 5' TGATTCGCTTCACTTTCTCCA 3'	110
Tlr4	NM_019178.1	Forward: 5' AAATGGCAATCCTTATCAATCATTAG 3'	107
	10000000000000000000000000000000000000	Reverse: 5 CIGATATCCICICIGITGGTAGITA 3	107
Tnf	NM_012675.3	Porward: 5' GGGGCCACCACGCTCTTCTGT 5'	180
		Reverse: 5' CTCCGCTTGGTGGTGGTTGCTACGAC 5'	100
Vegfa	NM_001110333.2	Porward: 5 CAGAAAATCACIGIGAGCCIIG 3	214
-		Reverse: 5' GIGAGAGGICTAGITCCCGA 3'	214

5. táblázat RT-qPCR vizsgálatokhoz használt primerek

dc_1685_19 IV.7.2. Géncsendesítés

A géncsendesítéshez használt reagenseket az Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) szállította. A HK-2 sejteket 10 nm S1R specifikus vagy negatív kontroll siRNS-el transzfektáltuk Lipofectamine 2000-rel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A sikeres transzfekciót 10 nm fluoreszcensen jelölt siRNS-sel, Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) vizsgáltuk. A géncsendesítés hatékonyságát Western blottal ellenőriztük (*23. ábra*).



23. ábra A Sigma-1 receptor géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzése HK-2 sejtekben (S1R: Sigma-1 receptor, +p<0,05 *vs* negatív kontroll, átlag ± SEM, N=6/csoport, Hosszú Ádám PhD dolgozatából engedéllyel)

IV.7.3. Western blot

A megfelelő szövetminta vagy sejtszuszpenzió azonos mennyiségű részéből fehérje homogenizátumot készítettünk. A NKA, illetve a S1R szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatához a sejtlizátumot először frakcionáltuk Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific, Waltham, MA, US) segítségével. A citoplazmatikus, membrán, szolubilis nukleáris, kromatin-kapcsolt nukleáris és citosztkeletális részek szétválasztása után a további feldolgozás a többi szuszpenzióval azonos módon történt az alábbiak szerint.

A mintákat 4°C-os lízis pufferben [(pH 7,4) 1 M tris(hidroximetil)aminometán, 0,5 M etilénglikol-tetraecetsav, 1% Triton X-100, proteáz és foszfatáz inhibitorok: 1 mg/ml approtinin, 5 mg/ml leupeptin, 0,5 M fenilmetánszulfonil fluorid, 0,25 M nátrium-fluorid, 0,5 M nátrium orthovanadát; (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország)] Fastprep RP120 homogenizátorral (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) homogenizáltuk. A minták összfehérje koncentrációját Bio Rad Protein Assay Kit-tel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) határoztuk meg és 10 μg/μl-re állítottuk be.

A fehérjeizolátumot 4x-es Laemmli pufferben (12,5 mM TRIS-HCl pH=6,7, 4% nátrium dodecil szulfát (SDS), 4% merkaptoetanol, 15% glicerol, 0,01% brómfenolkék) denaturáltuk, majd a detektálandó fehérje nagyságától függően (7-12%) SDS-poliakrilamid gélen (Bio-Rad Laboratories. Hercules, CA, USA) szobahőmérsékleten, 200 V áramerősségen futtattuk. A blottolás során a fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra transzferáltuk gyorsblottoló készülékkel (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA). A fehérjetranszfer sikerességét 1%

Ponceau-S (Sigma Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA), 25% ecetsav (Reanal Kft. Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékkel ellenőriztük. Ezután a membránt szobahőmérsékleten 1 órán keresztül blokkoló oldatban (5% BSA- tris-pufferelt sóoldat, TBS) inkubáltuk. Blokkolás után a membránt egy éjszakán keresztül, 4 °C-on inkubáltuk a különböző elsődleges ellenanyagokkal (*6. táblázat*) Másnap ismételt mosásokat (TBS-0,05% Tween20) követően a membránokat szobahőmérsékleten, 1 órán át inkubáltuk az elsődleges antitestre specifikus torma-peroxidáz enzimmel konjugált másodlagos antitesttel (*6. táblázat*). Az előhívást ECL plus reagenssel (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) kemilunineszcens módszerrel Versa Doc készülékkel végeztük (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA). A jelet *Quantity One* szoftverrel (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA) denzitometráltuk és a Ponceau-S festés által kapott összfehérje mennyiségre és belső kontrollra korrigáltuk.

Célfehérje neve	Gyártó	Kat.szám	Fajt	Hígítás
αSMA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	A2547	egér-monoklonális	1:500
BDNF	Abcam, Cambridge, MA, USA	108319	nyúl-monoklonális	1:1000
CTGF	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	SC-14939	kecske- poliklonális	1:500
Endothelin-1	Abcam, Cambridge, MA, USA	117757	nyúl- poliklonális	1:1000
EPO	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	SC-5290	egér- <u>monoklonális</u>	1:500
Furin	Abcam, Cambridge, MA, USA	183495	nyúl- monoklonális	1:2000
HIF-1a	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab2185	nyúl- <u>poliklonális</u>	1:1000
HSF-1	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	sc-393677	egér- <u>monoklonális</u>	1:1000
HSP27	Novus, Cambridge, UK	NBP2-32972	egér- monoklonális	1:1000
HSP70	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	4872S	nyúl- poliklonális	1:1000
MMP3	Abcam, Cambridge, MA, USA	52915	nyúl- <u>monoklonális</u>	1:1000
NF-KB	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	C22B4	nyúl- <u>monoklonális</u>	1:1000
Na+/K+-ATP-áz	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	sc-21712	egér- <u>monoklonális</u>	1:1000
nNOS.	Santa Cruz <u>Biotechnology</u> Santa Cruz, CA, USA	sc-5302	egér- <u>monoklonális</u>	1:1000
OGA	Proteintech Europe Manchester, UK	14711-1-AP	nyúl- poliklonális	1:1000
O-GlcNAc	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	07764	nyúl- <u>poliklonális</u>	1:1000
OGT	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	O6264	nyúl- poliklonális	1:1000
p75Ntr	Abcam, Cambridge, MA, USA	52987	nyúl-monoklonális	1:500
p-Akt	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	9271	nyúl- poliklonális	1:1000
p-CREB	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	87G3	kecske-monoklonális	1:500
p-eNOS	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	9571	nyúl- poliklonális	1:1000
PDGF	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA	sc-7878	nyúl- <u>poliklonális</u>	1:500
p-ERK	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA	sc-7383	egér- <u>monoklonális</u>	1:500
p-JNK	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	9251	nyúl- poliklonális	1:1000
SGLT1	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab14686	nyúl- <u>poliklonális</u>	1:50
SGLT2	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab37296	nyúl-poliklonális	1:50
TPA	Abcam, Cambridge, MA, USA	157469	nyúl-monoklonális	1:1000
<u>TrkB</u>	Santa Cruz <u>Biotechnology</u> , Santa Cruz CA, USA	sc-8316	nyúl- poliklonális	1:500
VEGF-A	Abcam, Cambridge, MA, USA	ab46154	nyúl-poliklonális	1:1000
Kecske IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA	sc-2020	kecske	1:3000
Egér IgG	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	7076	kecske	1:3000
Nyúl IgG	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	7074	kecske	1:3000

6. táblázat Western blot vizsgálatokhoz használt antitestek
dc_1685_19 IV.8. Statisztikai kiértékelés

A megfelelő statisztikai erő eléréséhez szükséges csoportonkénti minimális mintaszámot előzetes power analízissel számoltuk ki, az egyes kísérletekben ezekkel az esetlegesen eltérő mintanagyságokkal dolgoztunk. Az adatok kiértékelését (ahol nincs másképp feltüntetve) GraphPad statisztikai szoftverrel végeztük (6.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Elsőként normalitástesztet végeztünk Kolmogorov és/vagy D'Agostino módszerrel, majd ha az adatok a tesztek alapján normál eloszlást mutattak, akkor egyutas ANOVA (Analysis of variance) és Bonferroni post-hoc tesztet használtunk. Amennyiben nem normál eloszlású volt az adatsor Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az állatok túlélését Kaplan-Mayer analízissel (Log-rank teszt) értékeltük. Az eredményeket az egyes újságok követelményéhez igazodva átlag \pm SD vagy átlag \pm SEM illetve medián \pm range formában adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a p<0,05 értéket tekintettük.

dc_1685_19 V. EREDMÉNYEK

Ez a fejezet részletesen tárgyalja azokat a kísérleteket, melyeket az elmúlt évtizedben munkacsoportommal végeztünk a bevezetésben és a célkitűzésekben megfogalmazott kérdések megválaszolására. Az eredmények mindegyike nemzetközi publikációban megjelent, egyes kísérletsorozatoknál nem a teljes cikk, hanem csak egyes adatok kerülnek bemutatásra a dolgozatban. Tekintettel arra, hogy a közlemények számos komplex ábrát, több esetben külföldi kollaborátorral közösen publikált eredményt tartalmaznak, egyes ábrákat eredeti formában angolul tüntettem fel, az ábramagyarázatban szerepel az idegen kifejezések feloldása.

V.1. Diabétesz és depresszió

V.1.1. SIR agonista fluvoxamin (FLU) kezelés T1DM asszociált depresszió állatmodelljében

A kísérletsorozat célja annak igazolása, hogy (i) T1DM-ben a krónikus hiperglikémia következtében depresszióra jellemző viselkedés alakul ki (ii) a depressziót a S1R agonista FLUkezelés mérsékli (iii) a folyamatban a S1R-BDNF útvonal szerepet játszik. A kísérletek jelentős részét Dr. Lénárt Lilla PhD hallgatóm végezte.

V.1.1.1. A FLU kezelés hatása a metabolikus és neuroendokrin paraméterek változására

Hét héttel az STZ injekciót az emelkedett vércukor- és fruktózamin szintek, illetve a kisebb súlynövekedés igazolták a DM kialakulását, a magasabb koleszterin és triglicerid szintek a DM okozta lipidanyagcsere zavarát jelezték. A FLU kezelés a vércukor és fruktózamin értékeket nem befolyásolta, a szérum lipid-szinteket mindkét dózisban csökkentette. A májfunkciós értékek (GOT, GPT) egyik csoportban sem változtak (7. táblázat).

	Kontroll	Diabétesz (D)	D+FLU20	D+FLU20+NE100	D+FLU2	D+FLU2+NE100
Súlynövekedés (Δg)	136±9,05	66,8±9,49*	91,2±12,6*	67,1±14,7*	85±12,5*	87,5±5,90*
Glükóz (mmol/l)	12,3±0,59	44,5±3,22*	34,5±2,27*	48,0±2,08*	30,2±4,61*	39,7±2,67*
Fruktózamin (µmol/l)	149±2,17	254±3,48*	252±7,58*	267±7,66*	242±4,86*	264±11,1*
Koleszterin (mmol/l)	1,87±0,09	2,43±0,08*	1,96±0,06#	2,09±0,11	1,72±0,12#	1,84±0,11
Triglicerid (mmol/l)	0,75±0,09	2,79±0,43*	1,26±0,09#	1,80±0,20*	1,26±0,25#	1,78±0,43*
GOT (U/l)	184±14,6	188±25,7	209±26,4	179±21,4	203±20,5	189±11,6
GPT (U/l)	52,5±1,89	68,4±8,01	74,5±3,18	72,6±7,14	74,0±6,70	72,6±13,8

7. táblázat Metabolikus laborparaméterek kontroll, kezeletlen (D), ill. 20 mg/ttkg (D+FLU20) vagy 2 mg/ttkg (D+FLU2) vagy FLU + 1 mg/ttkg NE100-zal kezelt állatokban, FLU: fluvoxamin, GOT: glutamát-oxálacetát aminotranszferáz, GPT: glutamát-piruvát-transzamináz (átlag ± SEM, *p<0,05 vs. Kontroll; #p<0,05 vs. D; N=7-8/csoport) [215]

Depresszió és krónikus stressz állatmodelljében jellegzetes neuroendokrin elváltozás a tímusz tömegének csökkenése és a mellékvese megnagyobbodása [216], melyet kísérleteinkben mi is észlelünk. DM hatására a tímusz tömege csökkent, a mellékvese hipertrofizált, melyet sem a FLU, sem az antagonista NE100 nem befolyásolt. Klinikai vizsgálatokból ismert, hogy depresszióban, illetve cukorbetegségben alacsonyabb a szérum BDNF mennyisége [217, 218]. Kísérleteinkben visszaigazoltuk, hogy DM-ben jelentősen csökken a szérum BDNF szintje, melyet az egyes kezelések nem változtattak *(8. táblázat)*.

	Kontroll	Diabétesz (D)	D+FLU20	D+FLU20+NE100	D+FLU2	D+FLU2+NE100
Mellékvese relatív súlya (g/ttkg)	0,11±0,00	0,18±0,01*	0,20±0,01*	$0,20{\pm}0,02^{*}$	0,19±0,01*	$0,20\pm0,02^{*}$
Tímusz relatív súlya (g/ttkg)	1,64±0,14	0,82±0,12*	$0,80{\pm}0,07^*$	$0,73{\pm}0,08^{*}$	0,69±0,06*	0,64±0,16*
Szérum BDNF szint (µg/ml)	7,78±0,78	3,78±0,21*	3,66±0,43*	3,62±0,30*	4,61±0,45*	$2,89{\pm}0,38^*$

8. táblázat Neuroendokrin paraméterek (mellékvese, tímusz testtömegre vonatkoztatott tömege) és **szérum BDNF** szintje, kontroll, kezeletlen (D), ill. 20 mg/ttkg (D+FLU20) vagy 2 mg/ttkg (D+FLU2) vagy FLU + 1 mg/ttkg NE100-zal kezelt állatokban, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, FLU: fluvoxamin (átlag ± SEM, *p<0,05 *vs.* Kontroll; N=7-8/csoport) [215]

V.1.1.2. A FLU mérsékli a DM-indukált depresszió-szerű viselkedést T1DM állatmodellben

A 7-hetes DM során az állatokban depresszióra jellemző viselkedésmintázat alakult ki, melyet az erőltetett úszásteszt során a lebegés időtartamának növekedése jellemzett. Ezzel párhuzamosan csökkent a mobilitáshoz kapcsolódó mozgások aránya. Külön vizsgálva az úszás és a kapálózás időtartama szignifikánsan alacsonyabb volt. A FLU kezelés antidepresszáns hatása dózisfüggően jelentkezett, 20 mg/ttkg adagban javította a depresszióra jellemző mintázatot, míg a 2 mg/ttkg dózis nem változtatott a paramétereken. Az S1R antagonista NE100 felfüggesztette a FLU hatását *(12. ábra)*, ami arra utal, hogy az antidepresszáns hatás – legalábbis részben – S1R mediált.

Annak elkülönítésére, hogy a mobilitás csökkenése a DM-hez kapcsolódó rosszabb fizikai állapot következménye-e, az úszásteszt mellett elvégeztük a nyílt porond tesztet, mellyel az állatok lokomotoros aktivitása vizsgálható. A lokomotoros aktivitás, (mely a vonalátlépések számával mérhető) DM-ben csökkent, azonban sem a FLU, sem az NE100 kezelés ezen a paraméteren nem változtatott; vagyis nem eredményezett fizikai állapotjavulást. Mindez bizonyítja, hogy a nagyobb dózisú FLU-val kezelt állatok fokozott mobilitása, nem a jobb fizikai állapotuk, hanem a készítmény S1R-mediált antidepresszív hatásának következménye.



Mobilitás időszázalék (%)	Kontroll	Diabétesz (D)	D+FLU20	D+FLU20 +NE100	D+FLU2	D+FLU2+NE100
Kapálózás	31,1±3,11	17,8±0,87*	21,0±1,90	17,7±3,06*	24,5±2,52	26,4±3,58
Úszás	49,1±3,50	28,8±6,36*	44,3±2,31	28,1±3,68*	25,3±3,85*	27,1±6,24*
Búvárkodás	0,42±0,18	0,33±0,22	2,26±1,31	0,11±0,11	1,22±0,37	0,34±0,21
Vonal-átlépések száma	398±52,4	156±48,2*	91±25,9*	142±34,6*	87,0±41,9*	60,5±21,9*

24. ábra Az erőltetett úszás teszt és a porond teszt értékelése Az alsó táblázat részletesen mutatja az egyes mobilitási paraméterek időszázalékát és a vonalátlépések számát kontroll, kezeletlen (D), ill. 20 mg/ttkg (D+FLU20) vagy 2 mg/ttkg (D+FLU2) vagy FLU + 1 mg/ttkg NE100-zal kezelt diabéteszes állatokban, FLU: fluvoxamin (átlag \pm SEM, *p<0,05 vs. Kontroll; N=7-8/csoport) [215]

V.1.1.3. A FLU aktiválja a S1R-BDNF jelátviteli tengelyt

A depresszió és a cukorbetegség kialakulása során elsődlegesen érintett agyi területek a hippokampusz és a prefrontális kortex [219], ezért a BDNF és S1R mRNS és fehérje szinteket ezekben az agyi régiókban határoztuk meg. Mivel az elsődleges végpontként tekintendő depressziószerű viselkedés kivédésében a 2 mg/ttkg FLU dózis hatástalan volt, ezért a fehérjeszinteket csak a 20 mg/ttkg FLU dózis esetén vizsgáltuk.

Míg a *Bdnf* és a *Sigmar1* mRNS expresszióját, sem a DM, sem a kezelések nem változtatták (*14. ábra*), addig a prekurzor és érett BDNF, valamint a S1R fehérje mennyisége is csökkent a DM patkányok hippokampuszában és prefrontális régiójában. FLU kezelés hatására mindegyik fehérje mennyisége emelkedett, a növekedést az NE100 felfüggesztette (*25. ábra*). Az RNS és fehérje szintek változása közötti eltérés a fehérjeszintézist követő poszttranszlációs módosulására utal.



25. ábra *Bdnf* (A, B) és *Sigmar1* (C, D) mRNS illetve fehérjeszintek kontroll, kezeletlen (D), ill. 20 mg/ttkg (D+FLU20) vagy FLU + 1 mg/ttkg NE100-zal kezelt diabéteszes állatok hippokampuszában és prefrontális régiójában. (*Bdnf*: brainderived neurotrophic factor, *Sigmar1*: Sigma-1 receptor, *Rn18s*: 18S riboszómális RNS, FLU: fluvoxamin, (N=7-8/csoport, átlag \pm SEM, *p<0,05 vs. Kontroll, **p<0,01 vs. Kontroll, ***p<0,001 vs. Kontroll; ##p<0,01 vs. D, ###p<0,001 vs. D, ###p<0,001 vs. D, \$\$\$p<0,01 vs. D+FLU20, \$\$\$p<0,001 vs. D+FLU20, NS: nem szignifikáns) [215]

V.1.2. A RAASi kezelés T1DM indukálta depresszióban

A cukorbetegséghez társuló komorbiditások kezelésében (hipertónia, DKD) a RAASi-k az elsőként választandó szerek. Egyes klinikai megfigyelések szerint azok a T1DM-ben szenvedő betegek, akik RAASi kezelésben részesülnek, lényegesen kevesebb antidepresszánst igényelnek [220]. Egy másik vizsgálat alapján az ARB candesartan szedése mellett a cukorbetegek depressziós tünetei enyhültek és javult a kognitív funkciójuk [221]. Mindezek alapján kísérletsorozatunk célja annak igazolása, hogy (i) a T1DM-ben kialakult depressziót a RAAS gátlók mérséklik, (ii) milyen mechanizmusok játszanak szerepet a hatás kialakításában (vazoreguláció, BDNF útvonal, gyulladás?) (iii) általános RAASi csoporthatásról van-e szó, vagy eltérő az egyes gyógyszercsoportok hatékonysága. A kísérletek vezető kutatói Dr. Lénárt Lilla és Dr. Balogh Dóra PhD hallgatók voltak.

V.1.2.1. A LOZ csökkenti a diabéteszes állatok depressziószerű viselkedését

Az ACEi és ARB-k alkalmazási preferenciájáról nincs konszenzus, folyamatos vita tárgya, hogy melyik kedvezőbb a DM betegek kezelésében. Kísérleteinket anyagi, állatetikai, humán erőforrás szempontok figyelembevételével először csak lozartánnal (LOZ) végeztük, azzal, hogy ha a kezelés hatására történik változás, akkor kiterjesztjük a vizsgálatokat a többi csoportra is.

Korábbi kísérleteinkkel összhangban cukorbeteg állatokban kialakult a depresszióra jellemző mozgásmintázat az úszásteszt során. A LOZ kezelés csökkentette a lebegés időszázalékát és ezzel párhuzamosan növelte a mobilitásban töltött időt. Külön vizsgálva az egyes mobilitási paramétereket, a kapálózás időszázaléka szignifikánsan növekedett a LOZ kezelt csoportban *(26. ábra)*. Hasonlóan a FLU-val végzett kísérletekhez porondteszt során a DM és a DM+LOZ csoportban csökkent a vonalátlépések száma, ami gyengébb lokomotoros aktivitást, rosszabb fizikai állapotot jelez [222].



26. Erőltetett ábra úszástesztet és porondteszt eredményei kontroll, kezeletlen (DM)és lozartán kezelt diabéteszes (DM+LOS) patkányokban (A-C). A lebegés (floating), úszás (swimming), kapálózás (struggling) és búvárkodás (diving) а mozgásidő teljes százalékában kerültek feltüntetésre. A porond tesztben a lokomotoros aktivitást a vonalátlépések száma (number of grids crossings) jelzi. (N=6-8/csoport, átlag ±SD, *p<0,05 vs. C; **p<0,01 vs. C; #p<0,05 vs. D)

V.1.2.2. A cukorbeteg állatok csökkent agyi perfúzióját a LOZ nem befolyásolja

Az agyi perfúzió csökkenése experimentális DM-ben ismert jelenség (22). Mivel a szisztémás vérnyomás nem változott egyik csoportban sem, a LOZ agyi vérátáramlást befolyásoló hatásának vizsgálatára [99mTc]HMPAO [223] felvétel módszerét választottuk. A [99mTc]HMPAO felvétel a DM állatok összes agyi régiójában csökkent, LOZ hatására az izotópfelvétel ugyanaz maradt, ami változatlan agyi vérátáramlást jelez (*27.ábra*). Az eNOS és az endotelin-1 a cerebrális véráramlás fő szabályozói. Az aktív foszforlilált eNOS fehérjeszint (Ser1177; peNOS) mindegyik csoportban azonos maradt, míg az endotelin-1 mennyisége nőtt a DM állatok hippokampuszában. A LOS kezelés egyik paramétert sem befolyásolta. Az ICAM-1, mely a cerebrovaszkuláris aktiváció egyik ismert markere, a DM állatok agyában megnőtt, szintjét a LOZ kezelés nem befolyásolta [222].



27. ábra Artériás középnyomás vizsgálata (A) és agyi véráramlás mérése kontroll, kezeletlen (DM) és lozartán kezelt diabéteszes (DM+LOS) patkányokban SPECT-MRI-vel (B-C). (D-E) peNOS és endothelin-1 fehérjeszintek Ponceau S-ra normalizálva (F-G). Α cerebrovaszkuláris aktiváció értékelése ICAM-1 - gyel. SUV: standardizált felvett érték (standardized uptake value), peNOS: foszforilált endoteliális nitric oxid szintáz, ICAM-1: intercelluláris adhéziós molekula 1, LOS: lozartán, MAP: mean arterial pressure, (nagyítás: 630x, lépték: 50 μ m, átlag ± SD, N=4-5/csoport képalkotó vizsgálatok és N=6-8/csoport gyulladásos markerek, *p<0,05 vs. C; **p<0,01 vs. C; #p<0,05 vs. DM, NS: nem szignifikáns)

V.1.2.3. A T1DM-ben aktiválódó neuroinflammációs folyamatokat a LOZ csökkenti

A mikroglia aktivációt *in vivo* SPECT-MRI vizsgálattal TSPO ligand [125I] CLINME izotóppal határoztuk meg. A totál TSPO felvétel DM-ben megnövekedett, a LOZ kezelés nem változtatott az aktivitáson. Hasonló mintázatot láttunk, ha az egyes agyi régiókat elkülönítve mértük (28. ábra). A mikroglia aktivációját P2Y12 immunfestéssel is vizsgáltuk. DM-ben a mikroglia aktivációját figyeltünk meg (sejttestek megvastagodása, sejtnyúlványok számának csökkenése), melyet a LOZ nem változtatott. Ugyanakkor a GFAP - pozitív asztrociták száma LOZ hatására csökkent (), ami arra utal, hogy a kezelés vagy közvetlenül vagy indirekt módon befolyásolja az asztrociták aktivációját. Mivel az agyi neuroinflammatorikus válasz a mikroglia-asztrocita kétirányú interakción alapul, [224], következőkben a proinflammatorikus citokin termelődést és jelátvitelt tanulmányoztuk a depresszióért felelős hippokampusz területén. DM-ben emelkedett *II1a, Il6* és *Tnf* mRNS szinteket detektáltunk és megnőtt a az IL-1 és TNF szignalizációjában fontos NF-κB fehérjeszintje. A LOZ kezelés mindegyik faktor mennyiségét csökkentette (28. ábra) [222].



28. ábra A neuroinflammáció változása kontroll, kezeletlen (D) és lozartán kezelt diabéteszes (DM+LOS) patkányokban. (A-B) A mikroglia aktivációt CLINME felvételen SPECT-MRI-vel mértük. (C) A nyilak a P2Y12-pozitív mikrogliára (megvastagodott sejttest és csökkent nyúlványok) mutatnak (nagyítás 630x, lépték: 50 µm). (D) GFAP immunfestés az asztrocita válasz (lépték: 100 µm). (E) NF-κB fehérje és Il1a, Il6 és Tnf mRNS szintek. Baloldali panel reprezentatív gélkép. A fehérjét Ponceau-S-re, az mRNS-t Rn18s expresszióra normalizáltuk. NF-kB: nukleáris faktor kappa-könnyűlánc- aktivált B sejtek, Illa: interleukin 1 alfa, Il6: interleukin 6, Tnf: tumor nekrózis faktor alfa, LOS: lozartán (átlag±SD, N = 4-5/csoport képalkotó vizsgálatok és N = 6-8/csoport többi mérés; *p<0,05 vs. C; **p<0,01 vs. C; ****p<0,001 vs. C; #p<0,05 vs. DM; ^{##}p<0,01 vs. DM; ^{###}p<0,001 vs. DM)

dc_1685_19 <u>V.1.2.4. A LOZ fokozza a BDNF szintézisét</u>

A proBDNF-ből intracelluláris (pl. furin) és extracelluláris (MMPk, serin proteáz-plazmin) enzimek hasítása révén keletkezik érett mBDNF. A plazmin aktivációját a plazminogén aktivátor TPA végzi. A DM patkányok hippokampuszában csökkent a proBDNF és az mBDNF fehérjeszintje, a csökkenést a LOZ visszafordította. A LOZ növelte a furin és az MMP3 mennyiségét, míg a TPA-t nem változtatta. Mindez arra utal, hogy a LOZ az átalakító enzimek termelésének növelésével facilitálja a BDNF érését (*29. ábra*).

A gyrus dentatusban a BDNF termelődéséért felelős sejteket BDNF, asztrocita (GFAP) és mikroglia (IBA1) hármas immunfestésével mutattuk ki. A BDNF legnagyobb mennyiségben az asztrocitákban lokalizálódott (*29. ábra*). A BDNF csökkent mennyiségével párhuzamosan, a BDNF pozitívan festődő asztrociták száma is kevesebb volt a DM patkányok agyában [222].



29. ábra A DM indukált BDNF csökkenést és lokalizáció változást a LOZ normalizálja (B) pro, (C) érett BDNF és (D-F) hasító enzimek fehérjeszintje kontroll. kezeletlen (DM) és lozartán kezelt diabéteszes (DM+LOS) patkányok hippokampuszában. Baloldalon reprezentatív gélképek. A fehérjét Ponceau Sre normalizáltuk. BDNF: brainderived neurotrófikus faktor, MMP: mátrix metalloproteináz, TPA: tissue-plazminogén aktivátor, LOS: losarta, (átlag \pm SD, N=6-8/csoport, **p<0,01 vs. C; ****p<0,001 vs. C; **p<0,05 vs. DM; ###p<0,001 vs. DM. NS: nem szignifikáns) (G) Hármas immunfestés BDNF, GFAPasztrocita és Iba1pozitív pozitív aktivált mikroglia. A nyilak BDNF pozitív asztrocitát jelölnek. (Nagyítás: 1000x, lépték: 200 µm)

dc_1685_19 <u>V.1.2.5. A LOZ hatása a hippokampális BDNF jelátiviteli útvonalra</u>

A proBDNF a p75Ntr útvonalon keresztül fokozza a neuronsejtek apoptózisát és csökkenti a szinaptikus aktivitást. A p75Ntr, pJNK és a proapoptotikus *Bax* szintje változatlan maradt, ami arra utal, hogy ez az útvonal DM hatására nem aktiválódik (*30. ábra*). A mBDNF szignalizációs mechanizmusok a TrkB receptoron keresztül segítik a neuronsejtek túlélését. A TrkB, pERK, pCREB fehérje mennyisége és az anti-apoptotikus *Bcl2* mRNS expressziója csökkent DM-ben, a LOS kezelés mindegyik fehérje és a *Bcl2 mRNS* szintjét is jelentősen megnövelte (*30. ábra*).

A Western blot eredményeket a gyrus dentatus immunhisztokémiai festése is megerősítette, a pCREB szintje LOZ hatására megnőtt, míg a DM nek önmagában nem volt hatása. A pCREB a neuronokban lokalizálódott, ahogy ezt a neuronális marker PGP-9.5 történő kol-festődés is alátámasztotta. A pozitív mikrogliát jelölő P2Y12, vagy az erekhez használt tomato lectinnel nem láttunk kettős jelölődést, ami arra utal, hogy a pCREB változások nem a hippokampális neuronok aktivációjának a kövektzménye. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a LOZ a BDNF szignalizáció serkentésén és a neuroinflammáció csökkentésén keresztül enyhíti a DM károsító hatásait és így mérsékelheti a depresszió tüneteit a patkányokban [222].



30. ábra. A lozartán hatása a mBDNF-TrkB jelátviteli útvonalra (B) p75Ntr, (C) pJNK, (E)TrkB, (F) pERK,(G) pCREB fehérjék változása reprezentatív gélképekkel kiegészítve (A) (D) Bax, (H) Bcl2 mRNS expresszió kontroll, kezeletlen (DM) és lozartán kezelt diabéteszes (DM+LOS) patkányok hippokampuszában A fehérjét Ponceau S -re az mRNS expressziót Rn18s-ra normalizáltuk (I) A gyrus dentatus területén jelentős pCREB festődés látszik a LOS kezelt csoportban, a pCREB a P2Y12-pozitív mikrogliával (zöld) vagy az erekkel (kék) nem kolokalizálódik. LOS: lozartán; BDNF: brainderived neurotrófikus faktor, p75Ntr: p75 neurotrofin receptor, pJNK: phosphorylated c-Jun N-terminal kinases, TrkB: tropomyosin receptor kinase B, pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinases, pCREB: phosphorylated cAMP response element-binding protein, Bax: Bcl-2-

associated X protein, *Bcl2*: B-cell lymphoma 2 (átlag+SD, N=6-8/csoport, *p<0,05 vs. C; **p<0,01 vs. C; #p<0,05 vs. DM; ###p<0,01 vs. DM; ###p<0,001 vs. DM. nagyítás: 1000x, lépték: C: 100 μ m; D: 50 μ m, NS: nem szignifikáns)

V.1.3. Egyéb RAASi kezelések neuroprotektív hatása T1DM indukált depresszióban

Következő kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy RAASi csoporthatásról van-e szó, illetve, hogy a RAASi különböző típusai (ACEi, MR antagonisták) eltérő módon befolyásolják-e a fenti folyamatokat? Tekintettel arra, hogy az agyi perfúzióban a RAASi hatástalanok voltak, ebben a kísérletsorozatban SPECT-MRI és agyi immunhisztológiai méréseket nem végeztünk, mert az jelentősen növelte volna a költségeket és a kísérletekhez használt állatok számát. A kísérletek jelentős része Dr. Balogh Dóra PhD hallgatóm munkája.

V.1.3.1. RAASi-k enyhítik a DM okozta depressziószerű tüneteket

A korábbi kísérletsorozathoz hasonlóan a mobilitási idő lecsökkent, a DM állatokban. A RAASi gátlók mindegyike növelte a mobilitás idejét, különböző mozgásmintázatokat egyesével vizsgálva bár tendenciájában az összes paraméter nőtt, szignifikáns javulást csak a RAM kezelés eredményezett. A porond teszt a korábbi eredményeinket megerősítette, vagyis a DM-ben csökkent vonalátlépések (rosszabb lokomotoros aktivitás) számát a kezelések nem változtatták *(9. táblázat)*.

Viselkedés teszt időszázalék	Kontroll	Diabéteszes (D)	D+ENA	D+RAM	D+SPI	D+EPL
Lebegés	19.2±10.1	54.1±12.2***	36.4±14.1§	30.2±12.6 ^{§§}	34.0±18.2§	37.8±4.5§
Mobilitás	80.8±10.1	45.9±12.2***	$63.7 \pm 4.1^{\$}$	69.8±12.6 ^{§§}	65.9±18.2 [§]	62.2±4.5 [§]
Kapálózás	31.2±8.8	18.4±2.1*	23.5±5.3	23.8±7.9	27.5±16.2	25.1±8.8
Úszás	49.2±9.9	27.1±13.6**	39.0±10.9	45.8±13.4§	36.7±10.2	33.8±7.1
Búvárkodás	0.4±0.5	0.4±0.6	1.1±1.2	0.2±0.3	0.9±0.4	2.1±0.7
Vonal-átlépések	364.5±161.0	156.7±127.5**	56.5±28.5	166.2±95.3	147.7±37.0	158.3±58.6

9. táblázat Porond teszt és erőltetett úszásteszt kontroll, kezeletlen cukorbeteg (D), enalapril (D+ENA) vagy ramipril (D+RAM) vagy spironolakton (D+SPI) vagy eplerenon (D+EPL) kezelt DM patkányokban. Az egyes mozgásmintázatok a teljes mozgási-idő %-ban kerültek feltüntetésre (átlag \pm SD, N=8 kontroll és D csoport és N=6 kezelési csoport; **p*<0,05 *vs.* kontroll; ***p*<0,01 *vs.* kontroll; ***p*<0,01 *vs.* kontroll; ***p*<0,01 *vs.* kontroll; ***p*<0,01 *vs.* kontrol; [§]*p*<0,05 *vs.* D; ^{§§}*p*<0,01 *vs.* D) [225]

V.1.3.2. Az AT1 és AT2 receptorok kifejeződése a diabéteszes patkányok agyában

Az Agtr1 mRNS expresszió a DM patkányok hippokampuszában magasabb volt, az Agtr2 nem változott. A kezelések közül az ENA és a SPI növelte az Agtr2 mRNS expresszióját (31. ábra).



31. ábra *Agtr1 és Agtr2* mRNS expresszió kontroll kezeletlen (D), enalapril (D+ENA) vagy ramipril (D+RAM) vagy spironolakton (D+SPI) vagy eplerenon (D+EPL) kezelt diabéteszes patkányok hippokampuszában. Az mRNS-t Rn18S expresszióra normalizáltuk. (átlag±SD, N=8 kontroll és D csoport és N=6 kezelési csoport, *p<0,05 vs. kontroll; p<0,05 vs. D; p<0,01 vs. D; p<0,01 vs. D;

V.1.3.3. A RAASi-k az agyi vérátáramlást nem változtatják, de csökkentik a neuroinflammációt

A MAP-ot a RAASi –k egyike sem változtatta, így abból indultunk ki, hogy a gátlószerek hatása a szisztémás vérnyomástól független. (*32. ábra*). A korábbiakhoz hasonlóan a vazoregulátor eNOS/nNOS-endotelin-1 útvonal elemei közül csak az endotelin-1 emelkedett DM-ben, a RAASi nem változtattak a fehérjeszinten. Mindez megerősíti a korábbi eredményt, vagyis, hogy a RAASi antidepresszás tulajdonsága ebben a DM modelben független az agyi vazoregulációs hatásuktól.

A hiperglikémia indukálta neuroinflammációt a LOZ-hoz hasonlóan a többi RAASi is mérsékelte. A DM-ben megemelkedet hippokampális NF-κB fehérjeszintet, valamint az *Il1a*, *Il6* és *Tnf* mRNS expresszióját a RAASi-k csökkentették (*32. ábra E-H*).



32. ábra RAASi kezelések hatása az agyi perfúzióra és a neuroinflammációra (A) Artériás középnyomás (MAP) kontroll, kezeletlen (D), enalapril (D+ENA) vagy ramipril (D+RAM) vagy spironolakton (D+SPI) vagy eplerenon (D+EPL) kezelt diabéteszes patkányokban. (B-D) foszforilált eNOS (p-eNOS), foszforilált nNOS és endotelin-1 protein szintek a hippokampuszban (E) Hippokampális NF- κ B fehérje (F-H) interleukin-1 α (*II1a*), interleukin-6 (*II6*) és tumor nekrózis faktor- α (*Tnf*) mRNS szintek. A fehérjéket Ponceau-S – ra, az mRNS-t Rn18S expresszióra normalizáltuk. (átlag ± SD, N=8 kontroll és D csoport és N=6 kezelési csoport, **p*<0,05 *vs*. kontroll; ***p*<0,01 *vs*. kontroll; ***p*<0,01 *vs*. D; ^{§§}*p*<0,01 *vs*. D; ^{§§§}*p*<0,001 *vs*. D) [225]

<u>V.1.3.4. A hippokampális BDNF szintet a RAASi kezelések növelik és aktiválják a TrkB jelátviteli</u> <u>útvonalat.</u>

Mind a proBDNF, mind az érett forma fehérje szintje alacsonyabb volt a DM patkányok hippokampuszában, a csökkenést a RAASi kezelések kivédték (*33. ábra*). Érdekes eredmény, hogy a különböző gátlószerek eltérő módon befolyásolták a hasítóenzimek expresszióját, míg az ACEi az extracelluláris MMP3, addig az MRi spironolakton és eplerenon a furin termelődést növelte. A TPA

mennyiségét egyik kezelés sem befolyásolta (*33. ábra*). A downstream útvonalak közül a p75NTr kaszkád nem változott, míg a TrkB jelátviteli út a RAASi kezelések hatására aktiválódott.



33. ábra proBDNF, mBDNF és átalakító enzimek illetve szignáltranszdukcióban résztvevő faktorok változása cukorbetegségben illetve RAASi kezelés hatására (furin, MMP3 és szerint) fehérjeszintje kontroll, kezeletlen (D), enalapril (D+ENA) vagy ramipril (D+RAM) vagy spironolakton (D+SPI) vagy eplerenon (D+EPL) kezelt diabéteszes patkányokban. A fehérjéket Ponceau S –ra, az mRNS-t Rn18S expresszióra normalizáltuk. BDNF: brain-derived neurotrófikus faktor, p75Ntr: p75 neurotrofin receptor, pJNK: phosphorylated c-Jun N-terminal kinases, TrkB: tropomyosin receptor kinase B, pERK: phosphorylated extracellular signal–regulated kinases, pCREB: phosphorylated cAMP response element-binding protein, *Bax*: Bcl-2-associated X protein, *Bcl2*: B-cell lymphoma 2. (átlag ± SD, N =8 kontroll és D csoport és kezelések N=6 /csoport; *p<0,05 vs. kontroll; **p<0,01 vs. kontroll; **p<0,01 vs. kontroll; [§]p<0,01 vs. D; ^{§§§}p<0,001 vs. D) [225]

dc_1685_19 V.2. A DKD kezelésének új lehetőségei

V.2.1. RAASi kezelés renoprotektív, antifibrotikus hatása DKD állatmodelljéban

Bár törekvésünk volt csoportonként több RAASi alkalmazása (ACEi: ramipril, enalapril, MRi: spironolakton, eplerenon) anyagi megfontolásból előfordult, hogy nem minden paraméter mérése történt meg az összes csoportban. A kísérletek nagy részét Kőszegi Sándor és Dr. Molnár Ágnes PhD hallgatóimmal végeztük.

V.2.1.1. A RAASi-k hatása a metabolitikus paraméterekre DKD állatmodellben

Korábbi kísérleteinkhez hasonlóan hét hét elteltével a DM-re jellemző kóros metabolikus laborparamétereket mértünk, melyet a *10. táblázat* összegez. Lassult a testtömeg-növekedése, emelkedtek a szérum vércukor, fruktózamin és lipid-szintek. A vérnyomás nem változott, mely egyrészt igazolja a RAAS-gátlók helyesen megválasztott non-depresszor dózisait, másrészt a nem kezelt diabéteszes állatoknál mutatja a Wistar törzs jellegzetességét. Ebben a modellben nem alakul ki hipertónia és kompenzatorikus tachikardia [226], feltehetően a DM következtében kialakuló neuropátia miatt, mely a vese mind szimpatikus, mind paraszimpatikus beidegzését károsítja [227, 228].

Paraméterek	к	D	D+ ENA	D+ RAM	D+ LOZ	D+ SPI	D+ EPL
MAP (Hgmm)	70,0 ± 3,15	69,4±5,93	66,2 ±2,33	72,3 ±2,79	70,3±7,65	77,4 ±8,16	72,3 ±5,48
Pulzus (BPM)	$380\pm8,30$	387±10,9	$355 \pm 9,7$	362 ± ,76	371 ± 6,13	346 ± 15,8	$333\pm6,75$
Testtömeg (g)	418 ± 8.23	*** 267±11.4	*** 291±13.3	*** 275±7.68	*** 263 ± 12.	*** 294±16.2	*** 284±12.5
Súlynövekedés		***	***	***	***	***	***
(Δg)	$223 \pm 11,5$	66,4±11,	90±15,7	70±7,07	71,4±11	79,7±11	$95,5 \pm 12,1$
Szérum glükóz		***	*§	***	***	***§	***
(mmol/l)	$12,7 \pm 0,59$	47,3±4,0	35,3±3,2	38,8±1,6	43,8±2,4	$39,5 \pm 2$	$43,8 \pm 2,45$
Fruktózamin		***	**	*	*	*§	*§
(µmol/l)	$150 \pm 2,09$	268±6,86	250±5,09	246 5,10	249±7,45	239±5,87	$229 \pm 6,85$
Koleszterin		**	ş		şşş	ş	ş
(mmol/l)	$1,69 \pm 0,04$	2,35±0,5	$1,80\pm,12$	2,21±0,1	1,5±0,05	$1,66\pm0,1$	$1{,}88\pm0{,}08$
HDL-koleszterin		*				*	*
(mmol/l)	$2,21 \pm 0,10$	1,55±0,2	1,77±0,2	$1,83\pm0,7$	1,87±0,1	1,3±0,13	$1{,}32\pm0{,}08$
Triglicerid		**	*§	*§	*§	*§	*§
(mmol/l)	$0,\!42\pm0,\!03$	$1{,}90\pm0{,}50$	$1{,}49 \pm 0{,}45$	0,98±0,3	$1,31\pm0,3$	$1,\!37\pm0,\!20$	$1{,}51\pm0{,}33$
GOT (U/I)	168 ± 8,2	221 ± 27	186 ± 21	194 ± 30	158 ± 31	156 ± 12	160 ± 14
GPT (U/I)	53,9 ± 1,53	$74,5\pm9,2$	76,2 ± 11	82 ± 11,4	89 ± 14,7	70,9 ± 6,7	74,3 ± 7,41

10. táblázat: Metabolikus paraméterek változása kontroll (K), kezeletlen (D), illetve enalaprillal (ENA), ramiprilel (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) vagy eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatokban. HDL: magas denzitású lipoprotein (átlag \pm SEM, N = 7-8/csoport, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *vs*. Kontroll, [§]<0,05 *vs*. D, ^{§§}p<0,001 *vs*. D; ^{§§§}p<0,01 *vs*. D)

dc_1685_19 <u>V.2.1.2. A RAASi kezelés mérséklik a veseműködés beszűkülését DKD-ban</u>

A vizsgálat végére a cukorbeteg állatokban a DKD-ra jellemző funkcionális károsodások jelentkeztek: nőtt a vese/testtömeg arány, a szérum kreatinin, karbamid szint, csökkent a kreatininclearence, fokozódott a glükózürítés és a mikroalbuminúria. A RAASi kezelések általában (eltérő mintázattal) de csökkentették a vese hipertrófiát, mérsékelték a vesefunkció beszűkülését és a cukor ill. fehérjeürítést *(11. táblázat)*.

Paraméterek	K	D	D+ENA	D+RAM	D+LOZ	D+SPI	D+EPL
Vese/testtömeg x 100	$0,71 \pm 0,05$	1,61 ±0,32*	1,42 ±0,32	1,33 ±0,21#	1,35 ±0,12#	1,31 ±0,08#	1,33 ±0,21#
Se- kreatinin (µmol/l)	55,3 ±1,40	66,3 ±2,25*	66,3 ±3,41*	60,5 ±1,83	67,6 ±3,08*	65,0 ±2,51*	65,1 ±2,95*
Se-Karbamid (mmol/l)	$8,09 \pm 0,18$	28,3 ±3,08*#	18,8 ±2,24*#	19,3 ±1,29*#	18,1±1,84*#	21,0 ±1,04*#	18,6 ±1,39*#
Glükozúria (mmol/l)	DN	371 ±28,3*	312 ±22,3*	300 ±40,8*	$374 \pm 26,7*$	312 ±32,6*	314 ±24,5*
Mikroalbuminúria (mg/24h vizeletben)	DN	95,8±15,9*	99,6 ±11,0*	96,4 ±12,7*	81,9 ±29,3*#	71,2 ±6,04*#	69,3 ±14,4*#
Kreatinin-clearence (ml/min)	$1,02 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,08*$	1,08 ±0,16#	0,98 ±0,04#	$0,89 \pm 0,10$	$0,98 \pm 0,10 \#$	$1,08\pm 0,10 \#$

11. táblázat Renális laborparaméterek kontroll (K), kezeletlen (D), illetve enalaprillal (ENA), ramiprilel (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) vagy eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatokban. Se-szérum (átlag \pm SEM, N= 7-8/csoport, *p<0,05 *vs*. Kontroll; #p<0,05 *vs*. D)

A vizelettel ürülő ECM átalakulás markerek non-invazív mérése külföldi kollaborációban történő, drága vizsgálat, ezért az ACEi csoportok esetében csak a ramipril csoportban végeztük el, mert ez a konvencionális vesefunciós paraméterek esetében kedvezőbb hatást mutatott, mint az enalapril. DM-ben mindegyik marker mennyisége megemelkedett – jelezve a fibrózis kialakulását – a kezelések közül csak az eplerenon volt hatékony (uC3-nál) (*34. ábra*).



34. ábra Vizelet uC3M, TUM és rPRO-C3 szintek kontroll (K), kezeletlen (D), illetve ramiprilel (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) vagy eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatokban. (uC3M: collagen type III degradation fragment, TUM: tumstatin, rPRO-C3: N-terminal pro-peptide of rodent type III collagen) (átlag \pm SEM, N= 7-8/csoport, *p<0,05 *vs*. Kontroll; #p<0,05 *vs*. D) [229]

V.2.1.3. RAASi kezelések mérsékelték a vese szövettani károsodását DKD-ban

A kontroll állatok veséje egészséges struktúrát mutatott, míg a DM-ben a kapilláris lumenek beszűkültek és a glomerulusok belsejében az ECM mennyisége megemelkedett. A RAAS-gátlók jelentősen csökkentették az ECM felhalmozódását *(37. ábra)*.



35. ábra Mezangiális mátrix kiterjedése kontroll, kezeletlen (D), illetve enalaprillal, ramiprilel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatokban (átlag \pm SEM, N = 7-8/csoport, 400x nagyítás; lépték: 50 µm, \rightarrow mezangiális mátrix (püspöklila), *p<0,05 *vs*. Kontroll; #p<0,05 *vs*. D)

A DKD-ban kialakuló fibrózis során felszaporodó kollagénben dús kötőszöveti lerakódást Masson- Trichrommal és Sirus Reddel vizsgáltuk, utóbbi specifikusan kollagén I-et és kollagén IIIat fest. DM-ben a vese interstíciumban jelen lévő kollagén mennyisége nőtt, melyet az összes RAASi jelentősen csökkentett. Hasonló jelenséget láttunk Sirius-red festett metszeteken is. (*36-37. ábra*).



36. ábra Fibrotikus szövet felszaporodása kontroll, kezeletlen, illetve enalaprillal, ramiprilel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatokban (átlag \pm SEM, N= 7-8/csoport, 400x nagyítás; lépték: 50 µm, — Fibrotikus szövet (kék), *p<0,05 vs. Kontroll; *p<0,05 vs. D)



37. ábra Kollagén-dús szövet felszaporodása kontroll, kezeletlen (D), illetve enalaprillal, ramiprilel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatokban (átlag ± SEM, N= 7-8/csoport, 400x nagyítás; lépték: 50 μm, → kollagén dús szövet (piros), *p<0,05 vs. Kontroll; #p<0,05 vs. D)

A kollagén mellett az ECM másik fő komponense a fibronektin, mely DM-ben a glomerulusokban jelentős megemelkedett és emellett a tubulointerstíciumban is megjelent. Míg a fibrotikus szövet összmennyiségét (Masson), ill a kollagének felszaporodását az egyes RAASi kezelések hasonló mértékben csökkentették, a fibronektin felszaporodás mérséklésében az aldoszteron antagonisták jelentősen hatékonyabbnak bizonyultak (38. ábra).



38. ábra Fibronektin-dús szövet felszaporodása kontroll (K), kezeletlen (D), illetve enalaprillal (ENA), ramiprillel (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) vagy eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatokban (átlag ± SEM, N= 7-8/csoport, 400x nagyítás; lépték: 50 μm, ^{***}p<0,001 *vs*. Kontroll; [#]p<0,05 *vs*. D, ^{###}p<0,001 *vs*. D)

dc_1685_19 V.2.1.4. A RAASi kezelés csökkentik fibrózis indukált növekedési faktorok szintjét DKD-ban

A profibrotikus növekedési faktorok, mint a TGF-β1, PDGFB, CTGF kulcsfontosságú a DKD során kialakuló hegesedés folyamatában. DM hatására a renális *Tgfb1*, *Pdgfb* és *Ctgf* mRNS expressziója egyaránt megemelkedett. A *Tgfb1*-et egyik RAASi sem, a *Pdgfb* és *Ctgf* szinteket az aldoszteron antagonisták csökkentették (*39. ábra*). Az ECM fehérjék felépítését és bontását (turnover-t) az MMP-k és inhibitoraik (TIMP) szabályozzák [230]. Az MMP2, és a TIMP1 mRNS expressziója emelkedett a diabéteszes állatok veséjében, jelezve a fokozott ECM átépülést (*39. ábra*). A RAASi-k (kivétel ramipril) csökkentették az MMP2 mRNS expressziót, legkifejezettebb hatást az aldoszteron antagonisták mutattak. A TIMP1 mRNS expresszióját a lozartán és eplerenon mérsékelte. Az *Mmp9* és a *Timp2* egyik csoportban sem változott (ábra bemutatásra nem kerül).



39. ábra Profibrotikus faktorok (A) és fibrózis markerek (B) mRNS expressziójának változása kontroll, kezeletlen (D), ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. Az mRNS szinteket *Rn18*S expresszióra normalizáltuk. *Tgfb:* Transforming growth factor - β 1, *Pdgfb*: platelet-derived growth factor, *Ctgf*: connective tissue growth factor (átlag ± SEM, N = 7-8/csoport, *p<0,05, **p<0,01 vs. kontroll; [§]p<0,05, ^{§§}p<0,01, ^{§§§}p<0,001 vs. D) [229]

DKD-ban renális fibroblasztok aktiválódnak és miofibroblasztokká differenciálódnak és *de novo*, nagy mennyiségű α -SMA-t expresszálnak és [231], mely a leggyakrabban alkalmazott miofibroblaszt marker. DM-ben az α -SMA mennyisége a tubulointerstíciális térben jelentősen megnőtt, a növekedést a RAASi kezelés mérsékelte (40. ábra).



40. ábra α -SMA lokalizációja és mennyisége kontroll, kezeletlen (D), illetve enalaprillal (ENA), ramiprillel (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) vagy eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatokban. Bal oldali panelen α -SMA fehérjemennyiség változása reprezentatív gélképekkel kiegészítve. A fehérjét Ponceau S-re normalizáltuk (átlag ± SEM, N= 7-8/csoport, 630x nagyítás; lépték: 20 µm, *p<0,001 *vs*. Kontroll; #p<0,05 *vs*. D) Kőszegi Sándor PhD disszertációjából engedéllyel

V.2.2. A hiperglikémia és a RAASi kezelés in vitro hatása a profibrotikus folyamatokra

A hiperglikémia és a RAASi direkt, a szisztémás RAAS aktivációtól független, profibrotikus hatásának vizsgálatára és a szignáltranszdukciós utak változásainak tanulmányozására in vitro kísérleteket végeztünk HK-2 és NRK-49 sejteken.

V.2.2.1. RAASi-k hatása a RAAS elemek expressziójára hiperglikémiás HK-2 és NRK-49 sejtekben

Első lépésben meghatároztuk az egyes RAAS komponensek expressziójának változását hiperglikéma is RAASi kezelést alkalmazását követően. Hiperglikémia hatására HK-2 sejtekben nőtt az angiotenzinogén, renin, és AT1R mRNS expressziója, az ACE1 nem változott. A fibroblaszt sejteken egyik csoportban sem történ változás (41. ábra).



41. ábra RAAS komponensek mRNS expressziója (A) HK-2 proximális tubuláris epitél; B) NRK-49F renális fibroblaszt sejteken kontroll, kezeletlen (HG), ill. ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt hiperglikémiás sejteken. Az mRNS szinteket Rn18S expresszióra normalizáltuk. HG: high glucose, (átlag \pm SEM; N=6 well/csoport; *p<0,05, **p<0,01 vs. kontroll; §p<0,05, §§p<0,01, #p=0,056 vs. HG)

V.2.2.2. RAASi-k hatása a RAAS elemek expressziójára HK-2 és NRK-49 sejtekben

In vitro kísérleteinkben a magas cukorkoncentráció okozta hiperozmolalitás és a hiperglikémia hatásainak elkülönítésére a HK-2 sejteket, normál, hiperglikémiás és mannózzal indukált hiperozmoláris körülmények között tenyésztettük. Mind a *TGFB1, PDGFB* és *CTGF* mRNS expresszió emelkedett a HG csoportban. A mannóz kezelt csoportban a *TGFB1* és a *PDGFB* nem

változott, míg a *CTGF* itt is nőtt (42. *ábra*). Mindez arra utal, hogy a *TGFB1 és a PDGFB* emelkedése inkább a hiperglikémia, míg a *CTGF* indukció a hiperozmolalitás és a hiperglikémia közös hatásának az eredménye. A RAASi kezelések a *PDGFB* és *CTGF* mRNS expressziót a kontroll szintjére csökkentették, míg a *TGFB1-t* nem változott. Mivel a *TGFB1* expresszió a kezelések hatására sem *in vivo* mintából a vesehomogenizátumban, sem *in vitro* körülmények között nem változott, a további vizsgálatokat csak a PDGF-re és a CTGF-re vonatkozóan végeztük el.



42. ábra Profibrotikus faktorok mRNS expressziója (A) hiperglikémiás (high glucose) és hiperozmoláris (mannitol) körülmények között tenyésztett, illetve (B) kontroll, kezeletlen (HG) vagy ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt hiperglikémiás HK-2 proximális tubulus sejteken Az mRNS szinteket Rn18S expresszióra normalizáltuk. (átlag \pm SEM; N=6 well/csoport; *p<0,05 vs. kontroll, ***p<0,001 vs. kontroll, \$p<0,05, NS: nem szignifikáns vs. HG) [229].

Tekintettel arra, hogy a proximális tubulusok által termelt profibrotikus faktorok közvetlenül hatnak a renális fibroblasztok proliferációjára, migrációjára, morfológiájára, illetve az ECM komponensek termelésére, következő lépésben – elsőként az irodalomban - ezeket a folyamatokat igyekeztünk egymástól függetlenül vizsgálni.

V.2.2.3. RAASi kezelések hatása a profibrotikus faktorok indukálta morfológiai változásra

A morfológiai változásokat és a citoszkeleton átrendeződését az aktin filamentumokhoz (Faktin) nagy specificitással kötődő falloidin festéssel vizsgáltuk. A kontroll NRK-49 sejtek elnyújtott alakúak, az F-aktin vékony diffúz, hálózatos elrendeződésű. Mindkét kezelés hatására a megnyúltabb sejtek longitudinális tengelye mentén az F-aktin mennyisége megnőtt, stressz kötegek és csomók alakultak ki elsősorban a fibroblasztok széleinek környékén. A PDGFB kezelés hatása kifejezettebbnek tűnt a morfológia változás és a mennyiségi növekedés tekintetében is (*43. ábra*).



43. ábra Morfológiai változások kontroll, PDGFB és CTGF/CCN2 kezelt NRK-49F sejteken Reprezentatív falloidin fluroeszcens immuncitokémiai képek, Piros – F-aktin, kék – sejtmag. A nyilak az aktin csomókat jelölik (400x és 1000x nagyítás, lépték: 50 ill. 20 μm)

V.2.2.4. RAASi-k hatása a profibrotikus faktor-indukált sejtproliferációra

A sejtproliferáció meghatározását proliferating cell nuclear antigen (PCNA) és Ki67 mérésével értékeltük. A PCNA a DNS szintészisben és repair-ben játszik szerepet és részt vesz a sejtciklus szabályozásában. Nyugalmi állapotban szinte detektálhatatlan, a sejtciklus G1 és S fázisában emelkedik a mennyisége [232]. A Ki67 csak az S, G1, G2 és M fázisban lévő proliferáló sejtek magjában mérhető, nyugalmi fázisban nincs jelen.

Kísérleteinkben az NRK-49F sejtek proliferálni kezdtek mindkét profibrotikus faktorral történő előkezelést követően, de szignifikáns emelkedést csak a PDGFB esetében észleltünk. A RAASi kezelés a PCNA expressziót csökkentette, a Ki67 nem változott (44. ábra)



44. ábra *Pcna* és *Ki67* proliferációs markerek mRNS expressziója kontroll, (A) PDGFB - ill. (B) CTGF - indukált, kontroll ill. ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt NRK-49F renális fibroblaszt sejteken. Az mRNS szinteket Rn18S expresszióra normalizáltuk (átlag \pm SEM; N=6 well/csoport; *p<0,05 *vs*. kontroll, [§]p<0,05 *vs*. PDGF, ^{§§}p<0,01 *vs*. PDGF)

dc_1685_19 <u>V.2.2.5. A RAASi kezelés mérsékli a PDGF és CTGF/CCN2 indukálta aSMA termelést</u>

A PDGFB és a CTGF egyaránt a PDGFR-β-hoz köt, ezért legelőször azt igazoltuk, hogy az NRK-49F sejtek expresszálják a receptort. Ezt követően kimutattuk, hogy a renális fibroblasztok α-SMA termelése mindkét profibrotikus növekedési faktorral történő kezelést követően emelkedik. A fehérje mennyiségét a RAASi-k a kontroll szintjére csökkentik vissza (*45. ábra*).



45. άbra PDGFR-β lokalizáció és αSMA fehérjemennyiség változása fibroblasztokon (A) Reprezentatív immuncitokémia: 1000x nagyítás; lépték: 20 μm, piros – PDGFRβ, kék – nucleus, α-simazizom aktin (αSMA) fehérjeszintek kontroll, (B) PDGFB-vel ill. (C) CTGF/CCN-nel kezelt, ill. ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt NRK-49F 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)

V.2.3. RAASi kezelés és az O-GlcNAciláció, mint lehetséges patomechanizmus

Egyre több adat áll rendelkezésre az *O*-GlcNAciláció szerepéről a DKD kialakulásában és progressziójában, azonban az eredmények zöme T2DM-re vonatkozik. A patomechanizmusban kulcsfontosságú intrarenális RAAS és megnövekedett *O*-GlcNAciláció közötti kapcsolatra utal, hogy proximális tubulus sejtekben glükóz vagy glükózamin adagolásával aktiválódik a hexózamin bioszintézis és nő az angiotenzinogén és renin mRNS-expresszió [134]. Hiperglikémiás mezangiumsejtekben az NF-K β O-GlcNAcilálódása megnövekedett TNF- α és vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (VCAM-1) termelődéshez vezetett, ami hozzájárult a gyulladás és fibrózis kialakulásához [149].

Mindezek alapján logikus kérdések, hogy a (i) hogyan hat a hiperglikémia a proximális tubulusok fehérjéinek *O*-GlcNAcilációjára, (i) változik-e az *O*-GlcNAciláció DKD-ban (iii) a RAASi kezelések – új renoprotektív mechanizmusként - mérsékelhetik az *O*-GlcNAcilációt.

Következő kísérletsorozatunkban Dr. Bánki Nóra Fanni és Dr. Gellai Renáta PhD hallgatóimmal ezt vizsgáltuk.

V.2.3.1. A hiperglikémia hatása a proximális tubulus fehérjék O-GlcNAcilációjára és az enzimek mennyiségére

A hiperglikémia hatásait vizsgálva mind 24 órás, mind 48 órás tenyésztést követően megőtt a proximális tubulus sejtekben a fehérjék *O*-GlcNAcilációja, köztük az 140 kDa molekuláris tömegű tartományba tartozó eNOS proteiné is. Mannitol hatására hasonló változást nem észleltünk, ez arra utal, hogy a növekedés közvetlenül a hiperglikémia, és nem a magas glükózkoncentráció okozta hiperozmolaritás következménye.

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 ncOGT szintje HG24 sejtekben nőtt, majd 48 órara normalizálódott. Az mOGT nem változott 24 óránál, azonban 48 órára a kontrollhoz képest csökkent (*46. ábra*).



46. ábra Fehérjék *O*-GlcNAcilációja, OGTés OGA izoformák HK-2 proximális tubulus sejteket mannitol illetve magas glükóz tartalmú tápfolyadékban tenyésztettük 24 (HG 24) vagy 48 órán (HG 48) keresztül. Reprezentatív gélképek és fehérjemennyiségek változása (A) *O*-GlcNAciláció, (B) nukleocitoplazmatikus OGT (ncOGT) és mitokondriális OGT (mOGT), (C) OGA hosszú (L-OGA) és rövid (S-OGA) izoforma. A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag \pm SEM, N = 12 well/csoport, **p< 0,01 *vs* kontroll, ^{***}p < 0,001 *vs*. kontroll, ^{###}p < 0,001 *vs*. mannitol; [§]p < ,05, ^{§§}p < 0.01 HG24, ^{§§§}p < 0,001 *vs*. HG24, NS – nem szignifikáns) [233]

A RAASi-k nem befolyásolták a hiperglikémia-indukált fehérje *O*-GlcNAcilációt (és OGT kifejeződést a proximális tubulus sejtekben (ábra bemutatásra nem kerül). Az OGA-S sem változott, viszont az OGA-L növekedett 24 órás enalapril és lozartán kezelés után (*47. ábra*).



47. ábra RAASi kezelés hatása az O-GlcNAcase hosszú izoformájának (OGA-L) fehérje szintjére HK-2 proximális tubulus sejteket magas glükóz tartalmú tápfolyadékban tenyésztettük 24 órán (HG 24) keresztül. A HG sejteket enalaprillal (HG24+Enalapril; 1 μ M), lozartánnal (HG24+Lozartán; 10 μ M) és eplerenonnal (HG24+Eplerenon; 10 μ M) kezeltük. Reprezentatív gélképek és OGA-L fehérjemnnyiségek változása. A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag ± SEM; N = 12 well/csoport,**p< 0,01 vs. Kontroll; ^sp<0,05; ^{\$\$\$\$}p<0,001 vs. HG24) [233]

V.2.3.2. A hiperglikémia hatása a proximális tubulus Akt-eNOS-NKA-HSP72 útvonalra

A pAkt fehérjemennyisége megnőtt HG24 sejtekben változatlan Akt szint mellett. 48 órára a pAkt mennyisége visszaállt a kontroll szintjére, az Akt pedig megemelkedett (*48. ábra*) Az eNOS Ser(1177)-n történő foszforilációját pAkt katalizálja, mely kulcsfontosságú az enzim aktivációjában [234]. Az emelkedett pAkt szint ellenére az aktív peNOS szint HG24-ben lecsökkent, ami arra utal, hogy az enzim foszorilációját (*48. ábra*) a hiperglikémia (esetleg a következményesen fokozódó *O*-GlcNAciláció) gátolja.



48. ábra eNOS és Akt, illetve foszforilált formájuk fehérje szintjeinek változása Reprezentatív gélképek és (A) peNOS, (B) eNOS, (C) peNOS/eNOS arány, (D) pAkt, (E) Akt, (F) pAkt/Akt arány fehérjemennyiségek változása HK-2 sejtekben magas glükóz tartalmú tápfolyadékban 24 (HG24) és 48 órán (HG48) át tartó tenyésztés után fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag \pm SEM; N = 12 well/csoport, *p< 0,05; **p< 0,01 *vs.* Kontroll; ^{\$}p<0,05 *vs.* HG24. NS: nem szignifikáns) [233]

A NKA mennyisége kezdetben nőtt, majd 48 órára minimálisan csökkent a kontrollokhoz képest. A HSP72 változása hasonló dinamikát mutatott, bár a mérséklődés a HSP72 esetében kifejezettebb volt, HG48-ra a kontroll szintre csökkent. Mannitollal tenyésztett sejtekben egyik időponban sem változott a fehérjék mennyisége, a hiperozmolaritás nem befolyásolta az expressziót (49. ábra).



49. ábra Na/K ATPáz (NKA) és a hősokk protein (HSP)72 fehérje mennyiségének változása Reprezentatív gélképek és (A) NKA (B) HSP72 fehérjemennyiségek változása magas glükóz, illetve mannitol tartalmú tápfolyadékban 24 (HG24) és 48 órán (HG48) át tartó tenyésztés után HK-2 sejtekben A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag \pm SEM; N = 12 well/csoport, **p<0,01 vs. Kontroll; ##p<0,01 vs. Mannitol; ^{\$\$}p<0,01 vs. HG24)

V.2.3.3. A RAASi kezelés hatása az O-GlcNAcilációra és az enzimek mennyiségére DKD-ban

A DM állatok veséjében fokozódott a fehérjék *O*-GlcNacilációja, melyet az összes RAASi kezelés csökkentett. Az irodalomban elsőként mutattuk ki a vese kortikális állományában a különböző OGT és OGA izoformákat. A renális ncOGT és mOGT mennyisége a cukorbeteg állatokban lecsökkent, a RAASi kezelés nem változtatott a fehérjeszinteken.

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 lozartán védte ki, az OGA-S változását mindegyik RAASi kezelés a kontroll szintjére mérsékelte (*50.ábra*).



50. ábra Az (A) *O*-GlcNAciláció, (B) OGT és (C) O- OGA izoformák fehérjemennyiségeinek változása kontroll, kezeletlen (D), enalaprillal, lozartánnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag \pm SEM, N = 7-8/csoport, ^{**}p<0,01 *vs.* kontroll, ^{***}p<0,001 *vs.* kontroll; \$ p<0,05vs. D, ^{\$\$\$}p<0,001 vs. D) [233]

V.2.3.4. Az Akt-eNOS-NKA-HSP72 útvonal változása RAASi kezelést követően DKD-ban

A kezeletlen cukorbeteg állatokban mind a peNOS mennyisége, mind a peNOS/peNOS arány csökkent. A RAASi kezelések növelték a peNOS szintjét, legkifejezettebb hatása a lozartánnak és az eplerenonnak volt. Ezzel párhuzamosan a DM-ben emelkedett eNOS szint a kezelések hatására csökkent (*51.ábra*). Sem az Akt, sem a pAkt, sem az arány nem változott a cukorbeteg állatokban, illetve a RAAS-kezelés hatására sem.



51. ábra eNOS és Akt, illetve foszforilált formájuk fehérje szintjeinek változása kontroll, kezeletlen (D), enalaprillal, lozartánnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. (A) peNOS, (B) eNOS, (C) peNOS/eNOS arány, (D) pAkt, (E) Akt, (F) pAkt/Akt A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag \pm SEM, N=7-8/csoport, ^{**}p<0,01 *vs.* kontroll; ^{\$}p<0,05 *vs.* D, ^{\$\$}p<0,05 *vs.* D, ^{\$\$\$}p<0,001 *vs.* D, NS-nem szignifikáns) [233]

Korábbiakban igazoltuk, hogy experimentális DKD-ban nő a renális NKA szintje, melyet az ANGII tovább növel. Kimutattuk azt is, hogy bár az enzim mennyisége nő, kevésbé aktív, mert DKDban fiziológiás helyéről, a bazálmembrán károsodása miatt a citoszólba, illetve az apikális membránra helyeződik át és ezáltal funkcióképtelenné válik [235]. Jelen kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy (i) a RAASi kezeléssel megakadályozható-e a kihelyeződés, illetve, hogy (ii) a citoszkeleton integritásáért felelős HSP72 változik-e a kezelések hatására.

DM-ben (korábbiakkal egyezően) emelkedett a fehérje mennyisége, melyet az enalapril nem; de a lozartán és eplerenon kezelés jelentősen –a kontroll szintjére - csökkentett. Az immunhisztológiai vizsgálat során kontrollokban a NKA a tubuláris bazálmembrán mentén helyezkedett el. A diabéteszes csoportban megjelent a fehérje az apikális membránon is, az áthelyeződést (melyet a citoplazmatikus festődés kiszélesedése jelez) az enalapril kivételével a RAASi kezelések mérsékelték (*52. ábra*).



52. ábra Na⁺/K⁺ ATPáz (NKA) fehérje mennyiség és lokalizáció változása (A) kontroll, (B) kezeletlen (D), (C) enalaprillal, (D) lozartánnal vagy (F) eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. Reprezentatív immunhisztokémiai képek Az egyes csoportokban a felső bal kép a fénymikroszkóppal készült kép, a bal alsó az immunfestéssel készült kép, a jobb alsó diagram a jelintenzitás változását mutatja a bal alsó képen lévő piros nyíl mentén. Zöld – NKA, kék – sejtmag. Nucl – sejtmag, Lu – lumen, Bm – bazálmembrán. 630x nagyítás, lépték: 10 μ m (E) A NKA fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (átlag ± SEM, N= 7-8/csoport, *p<0,05 *vs.* kontroll, [§] p<0,05 *vs.* D)

A cukorbeteg állatokban lecsökkent HSP72 fehérje mennyiségét a RAASi kezelések mérsékelten, de nem szignifikánsan emelték. A HSP72 a tubulusokba lokalizálódott. Konfokálisan metszeteken értékelve a NKA a HSP72- vel jól láthatóan kolokalizálódott (*53-54. ábra*).



53. ábra HSP72 fehérje mennyiség és lokalizáció változása (A) kontroll, (B) kezeletlen (D), (C) enalaprillal, (D) lozartánnal vagy (E) eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. Reprezentatív immunhisztokémiai (Piros – HSP72, kék – sejtmag, 630x nagyítás, lépték: 10 μ m) (F) A HSP72 fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. HSP: hősokk fehérje, (átlag ± SEM, N= 7-8/csoport, *p<0,05 vs. kontroll, NS – nem szignifikáns)



54. ábra HSP72 és Na⁺/K⁺ ATPáz kolokalizációja (A) kontroll, (B) kezeletlen (D), (C) enalaprillal, (D) lozartánnal vagy (E) eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. Reprezentatív fluroszcens immunhisztokémia, zöld –NKA, piros – HSP72, kék – sejtmag, sárga - kolokalizáció (nagyítás: 630x, lépték: 10 μm) HSP: hősokk fehérje

V.2.4. Az SGLT2i DAPA kezelés renoprotektív hatásának vizsgálata DKD-ban

Kísérleteink megkezdésekor még nem voltak nyilvánosak azok a klinikai tanulmányok (EMPA-REG OUTCOME, CREDENCE stb), melyek mostanra már egyértelműen alátámasztották az SGLT2 gátlók renoprotektív tulajdonságát. Ezen klinikai eredmények fényében talán még inkább magától értetődő korábbi kíváncsiságunk (i) javítja-e a dapagliflozin (DAPA) a DM következtében kialakuló vesekárosodást (ii) használható-e T1DM esetén is, (iii) milyen mechanizmus állhat a renoprotekció hátterében. Az irodalomban T1DM-hez társuló DKD-ban elsőként végzett kísérleteinket Dr. Hodrea Judit és Dr. Balogh Dóra segítségével végeztük.

V.2.4.1. A DAPA kezelés mérsékeli a T1DM-ben kialakuló anyagcserezavart

A várakozásoknak megfelelően a DAPA kezelés mérsékelte a magas vércukorszint okozta metabolikus változásokat, a testtömeg növekedés elmaradását, a vércukor és fruktózamin és lipidszinteket. A vércukorszint már a kezelés első hetében alacsonyabb volt, majd a második hét végére 41%-kal csökkent. A kísérleti periódus végére a kezeletlen csoport vércukorszintje közel kétszerese volt a DAPA-kezeltekének. DAPA hatására az állatok anémiája megszűnt. A LOZ-zal történő kombinációs terápia szinergista hatással nem járt. (*12. táblázat*)

Metabolikus paraméterek	Kontroll	Diabéteszes (D)	D + DAPA	D + DAPA + LOS
Testtömeg (g)	434±37.9	256±26.7**	333±39.2**§§	312±37.8**§§
Nem éhomi vércukorszint (mmol/L)	6.52±0.57	33.0±1.12**	17.7±5.63** ^{§§}	18.1±6.16** ^{§§}
Fruktózamin (µmol/L)	142±4.12	274±13.6**	206±34.2** ^{§§}	217±27.8** ^{§§}
Koleszterin (mmol/L)	1.98±0.14	2.69±0.41**	1.96±0.36 ^{§§}	2.26±0.34§
Triglicerid (mmol/L)	1.39±0.58	2.84±1.26**	$1.08{\pm}0.58^{\$\$}$	$0.91{\pm}0.20^{\$\$}$
LDL-C (mmol/L)	0.44±0.15	0.84±0.12**	$0.51 \pm 0.14^{\$\$}$	0.77±0.13**
GOT (U/L)	127±17.5	347±170**	191±25.4§	214±88.6§
GPT (U/L)	42.8±7.54	166±82.2**	84.6±16.3 ^{§§}	65.2±10.8 ^{§§}
Hemoglobin (g/L)	155±16.0	88.3±9.50**	149±9.45 ^{§§}	153±8.08 ^{§§}
Glükozúria (mmol/L)	ND	346±47.1**	479±91.8**§	401±105**

12. táblázat DAPA kezelés hatása a metabolikus paraméterekre Kontroll, kezeletlen (D), dapagliflozin (D+DAPA) vagy DAPA+lozartán (D+DAPA+LOS) kezelt diabéteszes állatok metabolikus paramétereink változásai MAP: artériás középnyomás, LDL-C: alacsony denzitású lipoprotein-koleszterin, GOT: szérum glutamát-oxaloacetát transzamináz, GPT: szérum glutamát-piruvát transzamináz (átlag \pm SD, N=6 kontroll és a D csoport, N=7 kezelt csoport, *p<0,05 *vs.* kontroll, *p<0,05 *vs.* D, ^{§§}p<0,01 *vs.* D. ND: nem detektálható) [236]

dc_1685_19 <u>V.2.4.2. A DAPA kezelés mérsékeli a vesefunkció beszűkülését DKD-ban</u>

A DAPA kezelés jelentősen javította a vesefunkció beszűkülését, a retenciós paraméterek (szérum kreatinin, BUN) romlását, és a proteinúriát. A vizelettel ürülő KIM-1 és NGAL emelkedett szintjét a DAPA kezelés több, mint 50%-kal csökkentette, ez jóval enyhébb tubuláris károsodást jelez. A KIM-1 (R2=0.202, p=0.0252) és az NGAL (R2=0.546, p=0.0001) szintek korreláltak a kreatininclearence értékekkel, ami alátámasztja a használhatóságukat, mint a veseműködés új, non-invazív biomarkerei.

A hisztológiai változások korreláltak a vesefunkció beszűkülésével, a PAS festett metszeteken a glomerulusok hipertrófiáját, a bazálmembrán megvastagodását és a mezangiális mátrix expanzióját észleltük, melyek mindegyikét mérsékelte a DAPA kezelés, míg a LOZ hozzáadása további előnyt nem jelentett (*55. ábra*).



55. ábra A DAPA kezelés lassítja a DKD kialakulását (A-D) Kreatinin clearance, szérum kreatinin, urea nitrogén (BUN) és proteinúria kontroll, kezeletlen (D), dapagliflozin (D+DAPA) vagy DAPA+lozartán (D+DAPA+LOS) kezelt diabéteszes állatokban. (E-F) Vizelet kidney injury molecule-1 (KIM-1) és neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). (G-H) Creatinine clearance korrelációja a vizelet KIM-1 ill. NGAL szintekkel (I) Mezangiális terület kiterjedése, nagyítás 400x. lépték: 50 μ m. (átlag ± 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) [236]

dc_1685_19 <u>V.2.4.3. A DAPA kezelés mérsékeli a fibrotikus folyamatokat a vesében</u>

A renális fibrózis fentebb ismertetett új biomarkerei a kollagén remodellingre jellemző rPRO-C3, uC3M és TUM szintek a diabéteszes csoport vizeletében megemelkedett. A DAPA kezelés csökkentette a rPRO-C3 és TUM szintet, az uC3M változatlan maradt. A biomarkerek pozitív korrelációt mutattak a tubulointerstíciális fibrotikus szövet mennyiségével. (rPRO-C3 (R2=0.4459, p=0.0003), uC3M (R2=0.1922, p=0.0364) and TUM (R2=0.2285, p=0.0182). Bízunk benne, hogy eredményeink elősegítik ezeknek a biomarkereknek a validálását a mindennapi klinikai gyakorlatban.

A renális *Tgfb1, Pdgfb* és *Ctgf* mRNS expressziója, magasabb volt, jelezve a profibrotikus folyamatok aktivitását. Meglepetésünkre a DAPA csak a *Pdgfb* és a *Ctgf* szintet csökkentette, a *Tgfb1* mRNS expresszió nem változott (hasonló jelenséget igazoltunk a korábbi RAASi végzett kísérletek során is). A kiterjed tubulointerstíciális fibrózist és ECM felszaporodást a DAPA hatékonyan csökkentette, amit jól jelez a miofibroblaszt markerként használt a-SMA alacsonyabb fehérjeszintje is. A LOS-zal történő kombináció további javulást nem eredményezett (*56. ábra*).



56. ábra A DAPA csökkenti a renális fibrózist DKD-ban (A-C) Vizelet rPRO-C3, uC3M és TUM kontroll, kezeletlen (D), dapagliflozin (D+DAPA) vagy DAPA+lozartán (D+DAPA+LOS) kezelt diabéteszes állatokban. (D-F) Renális platelet derived growth factor subunit B (*Pdgfb*) and connective tissue growth factor (*Ctgf*) mRNS expresszió *Rn18S* mRNS-re normalizálva. (G) Reprezentatív Masson festett szövettani képek illetve fibrotikus terület kvatinfikálása a teljes terület arányában (nagyítás 200x, lépték: 200 μ m) (H-J) korreláció a vizelet markerek és a Masson kiértékelés között, (K) SMA fehérje mennyisége az egyes csoportokban Ponceau-S re korrigálva (átlag ± 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) [236]

A kollagén felhalmozódást Picrosirius vörös metszeten értékeltük, a glomerulusokban az erek körül minimális festődést detektáltunk a kontroll állatokban, míg a cukorbeteg patkányokban a kollagén mennyisége a glomerulusokban és a tubulointerstíciális térben is jelentősen nőtt. A kollagén akkumulációt a DAPA csökkentette, a LOZ továbbí jótékony hatást nem eredményezett. Párhuzamosan a kollagénnel a fibronektin mennyisége is nőtt a diabéteszes állatokban noha kisebb mértékben. A fibronektin mRNS expresszióját a DAPA kezelés közel felére csökkentette (*57. ábra*).



57. ábra A DAPA kezelés csökkenti a kollagén és fibronektin felhalmozódást kontroll, kezeletlen (D), dapagliflozin (D+DAPA) vagy DAPA+lozartán (D+DAPA+LOS) kezelt diabéteszes állatokban. Reprezentatív (A) Picrosirius Red (nagyítás 200x, lépték: 100 μ m) és (B) fibronektin (nagyítás 400x, lépték: 50 μ m) festett szövettani képek illetve (C-D) fibrotikus terület kvatinfikálása a teljes terület arányában. Renális fibronektin (*Fn1*) mRNS expresszió *Rn18S* mRNS-re normalizálva. (átlag ± SD, N=6 kontroll és D csoport, N=7 kezelt csoportok, **p<0,01 vs. kontroll, [§]p<0,05 vs. D, ^{§§}p<0.01 vs. D) [236]

V.2.4.4. A DAPA csökkenti a fehérjék O-GlcNAcilációját a vesében és HK-2 proximális tubulus sejteken

Korábbi kísérleteink alátámasztották, hogy a fehérjék *O*-GlcNAcilációjának fokozódása fontos mechanizmus a direkt glükotoxicitás okozta renális fibrózis kialakításának DKD-ban. A DAPA kezelés önmagában és a LOZ-zal történő kombinációban is csökkentette az ncOGT és az sOGT szintjét, ezáltal a megemelkedett *O*-GlcNaciláció is mérséklődött a kezelt csoportokban. A glikozilált oldalláncok eltávolításáért felelős OGA szintek nem változtak (*58. ábra*).



58. ábra A DAPA kezelés csökkenti az O-GlcNAcilációt (A-D) *O*-GlcNAciláció, *O*-GlcNA transzferáz (OGT) és *O*-GlcNAcase (OGA) fehérjeszintek kontroll, kezeletlen (D), dapagliflozin (D+DAPA) vagy DAPA+lozartán (D+DAPA+LOS) kezelt diabéteszes állatokban. A fehérjét Ponceau-S-re normalizáltuk (E) Reprezentatív O-GlcNAc immunhisztokémiai festés a vesében. (nagyítás 400x, lépték: 50 μ m, átlag ± SD, N=6 kontroll és D csoport, N=7 kezelt csoportok, *p<0,05 vs. kontroll, **p<0,01 vs. kontroll, \$p<0,05 vs. D, \$p<0,01 vs. D] [236].

Proximális tubulus sejteken végzett vizsgálataink bizonyították, hogy hasonlóan az *in vivo* eredményekhez, a fehérjék *O*-GlcNAcilációja fokozódik hiperglikémiás körülmények között, és ezzel párhuzamosan nő az ncOGT és az sOGT szintje is. A kezelések az OGT szinteket és az *O*-GlcNAciláció mértékét csökkentették, az OGA nem változott. A mannitolos csoportban változásokat nem észleltük. A profibrotikus faktorok szintje hiperglikémiás körülmények között nőtt, a DAPA kezelés a *CTGF* expressziót csökkentette, a *TGFB1 és PDGFB* szintet nem változtatta (*59. ábra*).


59. ábra A DAPA kezelés csökkenti a hiperglikémia indukálta *O*-GlcNAcilációt proximális tubulus sejteken A HK-2 sejteket normál (5,5 mM) magas (35 mM) glükóz vagy mannóz (35 mM) tenyésztettük 24 órági. (A-D) *O*-GlcNAciláció, *O*-GlcNA transzferáz (OGT) és *O*-GlcNAcase (OGA) fehérjeszintek kontroll, mannitol, kezeletlen magas cukor (HG) dapagliflozin (HG+DAPA) vagy DAPA+lozartán (HG+DAPA+LOS) kezelt HG sejteken. (E) Reprezentatív O-GlcNAc fluroeszcens immuncitokémia és integrált denzitás (nagyítás 200x, lépték: 50 µm, zöld: *O*-GlcNAc, kék: sejtmag) (F-H) Transforming growth factor β (*TGFB1*), platelet-derived growth factor (*PDGFB*) és connective tissue growth factor (*CTGF*) mRNS expresszió, *RN18S* ra normalizálva (átlag ± SD, N=6 well/csoport, *p<0,05 vs. kontroll, **p<0,01 vs. kontroll, [§]p<0,05 vs. HG, ^{§§}p<0,01 vs. HG) [236]

V.2.4.5. A DAPA hatása a proximális tubulus sejtek hipoxiás károsodására

A DAPA hiperglikémiától független, hipoxiát javító hatását hipoxiás kamrával (1% O₂, 2 óra) vizsgáltuk. Hipoxia hatására a HIF-1 α mRNS és fehérje szintje közel kétszeresére emelkedett, a fehérjemennyiség növekedése a sejtek magjában volt a legkifejezettebb. A DAPA kezelés csökkentette a HIF-1 α szinteket és mérsékelte a nukleáris transzlokációt. A hipoxia hatására a HIF-1 α útvonal downstream elemei: EPO, VEGF-A, CTGF and PDGFB indukálódtak. A kezelések az EPO és a CTGF szintjét csökkentették és mérsékelték a PDGFB emelkedést (p=0.06) (60. ábra)



60. ábra A DAPA csökkenti a tubuláris hipoxiát (A) Hypoxia-inducible factor-1-alpha (HIF-1 α) fluroeszcens immuncitokémia, (B) mRNS expresszió, (C) fehérjeszint, (D) integrált denzitás, (E) sejtmag/citoszól arány (nagyítás 200x, lépték: 50 µm, zöld: HIF-1 α , kék: sejtmag) HK-2 sejtekben. (F-I) *EPO,VEGF-A, CTGF és PDGFB* mRNS expresszió, *RN18S*-ra, a fehérje Ponceau-S-re normalizálva (átlag ± SD, N=5-6 well/csoport, *p<0,05 vs. kontroll **p<0,01 vs. kontroll, §p<0,05 vs. hipoxia, §§p<0,01 vs. hipoxia) [236]

V.2.5. SIR agonista fluvoxamin kezelés, mint a DKD új terápiás lehetősége

V.2.5.1. A SIR jelen van a vesében

Igazoltuk, 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 (60 ábra).



eNOS

A S1R agonista kezelések renoprotektív hatásának vizsgálatára több kísérletsorozatot végeztünk. A 2 hetes kezeléssel vizsgáltuk, hogy (i) megállítja-e, visszafordítja-e a fluvoxamin kezelés a már kialakult vesekárosodást (ii) dózisfüggő-e a hatás (2 mg/tskg ill. 20 mg/tskg adagolást alkalmaztunk), (iii) S1R-mediált hatásról van-e szó (kombinációban az egyik csoport antagonista NE100-at is kapott). A 7-hetes kezelést a T1DM kialakulásától kezdve preventív céllal adtuk a DKD kialakulásának megakadályozására. A kísérleteket Dr. Vannay Ádám, Dr. Bánki Nóra Fanni munkatársaimmal, Veres-Székely Apor és Kőszegi Sándor PhD hallgatókkal végeztük.

A vizsgálatokat jelenleg is folytatjuk, kiegészítjük a folyamat további tisztázásra. Az itt bemutatott eredmények a S1R agonisták antifibrotikus hatását igazoló, elfogadott nemzetközi szabadalmunk kiindulási alapjaiként szolgáltak.

V.2.5.2. A FLU kezelés javítja a vesefunkciót DKD-ban

A korábbi kísérletsorozatokkal megegyező módon, az STZ után 7 héttel a vércukorszint és fruktózamin szintek emelkedése mellett az állatokban a DKD-ra jellemző vesefunkció beszűkülés laboratóriumi eltéréseit észleltük: a retenciós paraméterek nőttek, a kreatinin-clearence csökkent, fokozódott a frakcionált nátriumürítés és az albuminúria (*13. táblázat*). A FLU kezelések a renális paramétereket különböző mértékben javították. A 7-hetes hosszútávú kezelés volt a leghatékonyabb a veseműködés megőrzésében, az összes vesefunkciót jellemző érték javult. A kéthetes kezelések során az NE100 a paraméterek egy részének javulását felfüggesztette.

	Kontroll	Diabétesz (D)	D7FLU	D+FLU20	D+FLU20 +NE-100	D+FLU2	D+FLU2 +NE-100
Vércukor (mmol/L)	17.3±0.95	46.6±2.85*	50.31±3.7	36.6±2.62§	48,5±2,40\$	36.45±3.11§	40,8±3,00#
Fruktózamin (µmol/L)	152±11.0	254±8.52*	276±11.2§	252±18.5	267±7,66	242±12.8	264±11,1
Se-karbamid (mmol/L)	7.06±0.19	26.6±2.42*	17.3±1.49§	17.3±2.30§	24,3±2,27\$	18.8±1.68§	22,3±1,43
Se-kreatinin (µmol/L)	22.0±0.93	42.0±2.39*	27.0±2.24§	34.5±2.74§	37,0±4,39	31.8±2.94§	40,0±3,72
kreatinin-clearence (mL/min/100g)	12.8±0.57	3.15±0.20*	6.77±1.15§	3.73±0.49	3,25±0,25	4.73±0.69	4,06±0,58
Frakcionált nátriumürítés (%)	0.22±0.02	3.12±0.75*	0.40±0.03§	0.90±0.23§	1,33±0,39	0.62±0.12§	0,96±0,12
Albuminúria (mg/mL)	3.25±2.39	42.5±6.38*	20.8±9.51§	21.5±4.99§	73,3±15,8\$	24.3±5.77	42,8±7,92#

13. táblázat A FLU javítja a vesefunkciós paramétereket kontroll, kezeletlen (D); 7 hétig 20 mg/tskg (D7FLU) vagy a diabétesz ötödik hetétől 2 hétig 20 mg/tskg (D+FLU20), vagy 20 mg/tskg FLU + 1 mg/tskg NE100 (D+FLU20 +NE100) vagy 2 mg/tskg FLU-val (D+FLU2), 2mg/tskg FLU + 1 mg/tskg NE100 (D+FLU2+NE100) kezelt diabéteszes patkányokban, FLU: fluvoxamin (átlag± SEM, N=6-8/csoport *p<0,05 vs. kontroll; [§]p<0,05 vs. D)</p>

V.2.5.3. A FLU kezelés mérsékli a mezangiális mátrix expanziót DKD-ban

A DKD-ban megemelkedett mezangiális mátrix expanzió mértékét a glomerulusokban a FLU kezelések mindegyike mérsékelte. A héthetes, ill. a 20 mg/tskg dózissal történő kéthetes kezelés majdnem a kontroll szintjére csökkentetett a szövetszaporulatot. Az antagonista kezelés a protektív hatást felfüggesztette, alátámasztva a S1R szerepét (*62. ábra*).



62. ábra A FLU kezelés csökkenti a mezangiális mátrix expanzió kiterjedését kontroll, kezeletlen (D), kezeletlen (D); 7 hétig 20 mg/tskg (D7FLU) diabétesz ötödik hetétől 2 hétig 20 mg/tskg (D+FLU20), vagy 20 mg/tskg FLU + 1 mg/tskg NE100 (D+FLU20 +NE1000) vagy 2 mg/tskg FLU (D+FLU2) vagy 2 mg/tskg FLU + 1 mg/tskg NE100 kezelt diabéteszes patkányokban. Reprezentatív PAS festett szövettani metszetek ill. mezangiális matrix expanzió kvatinfikálása a teljes glomerulus terület arányában. FLU: fluvoxamin, (átlag \pm SEM, N=6-8/csoport, nagyítás: 200x, lépték: 50 µm *p<0.0001 *vs.* kontroll *p<0,0001 *vs.* D, *p<0,05 *vs.* D+2mg FLU 2 weeks, #p<0,001 *vs.* D+20mg FLU 2 weeks)

dc_1685_19 <u>V.2.5.4. A FLU kezelés csökkentette a renális fibrózist DKD-ban</u>

A DM miatt felszaporodott ECM mennyiségét a FLU kezelések mérsékelték, a hosszútávú és a 20 mg/tskg dózisú kezelés a fibrózis csökkentésében is hatékonyabbnak bizonyult, mint a 2 mg/tskg adag. A fibrózis markereként használt SMA szintje a kisebb dózisú FLU-val kezelt csoportban nem csökkent. Az antagonista kezelt csoportokban a protektív hatását nem észleltük (*63.ábra*).



63. ábra A FLU csökkenti a vesefibrózist kontroll, kezeletlen (D), kezeletlen (D); 7 hétig 20 mg/tskg (D7FLU) diabétesz ötödik hetétől 2 hétig 20 mg/tskg (D+FLU20), vagy 20 mg/tskg FLU + 1 mg/tskg NE100 (D+FLU20 +NE1000) vagy 2 mg/tskg FLU (D+FLU2) vagy 2 mg/tskg FLU + 1 mg/tskg NE100 kezelt diabéteszes patkányokban. Reprezentatív Masson festett szövettani metszetek illetve fibrotikus terület kvatinfikálása a teljes terület arányában. A fehérje mennyiséget Ponceau-S re korrigáltuk. FLU-fluvoxamin. (átlag ± SEM, N=6-8/csoport, nagyítás:200x, lépték: 50 μ m *p<0.0001 *vs.* kontroll *p<0.0001 *vs.* D, [§]p<0.05 *vs.* D+2mg FLU 2 weeks, #p<0.001 *vs.* D+20mg FLU 2 weeks)

dc_1685_19 <u>V.2.5.5. A SIR agonista kezelés csökkenti a renális fibroblasztok proliferációját</u>

Elvégeztünk néhány pilot kísérletet annak igazolására is, hogy a S1R agonisták direkten gátolják-e a fibrózis kialakulását. Ehhez a FLU-n kívül, egyéb, specifikus, más hatással nem bíró S1R agonistát alkalmaztunk (SA4503, PRE-084). Vizsgáltuk a renális fibroblasztok proliferációját MTT assay segítségével, illetve mértük az ECM termelődést picrossirius Reddel. A S1R agonisták mindegyike gátolta a PDGFB indukált fibroblaszt proliferációt (az SA és a FLU dózisfüggő módon), illetve csökkentette az ECM termelődését. Az NE100 felfüggesztette a FLU hatását, ez is megerősíti a S1R szerepét az antifibrotikus hatás kialakításában (*64. ábra*).



64. ábra A Sigma-1 receptor agonista hatóanyagok: fluvoxamin (FLU), SA-4503 és a PRE-084 gátolják a renális miofibroblasztok TGF β – indukálta extracelluláris mátrix (ECM) termelődését és PDGFB indukált proliferációját Az NRK-49F sejteket különböző koncentrációjú hatóanyagokkal 24 óráig kezeltük PDGFB (10 ng/ml) illetve TGF- β (0,5 nM) indukciót követően. (átlag ± SEM, N=6 well/csoport, n, *p<0,001 *vs.* kontroll, *p<0,05 *vs.* TGF ill. PDGF, [§]p<0,01 *vs.* PDGF+FLU)

V.3. Új stratégiák a vesetranszplantáció kimenetelének javítására

Amennyiben a DKD talaján vagy más okból kialakuló renális fibrózis folyamata nem állítható meg az hosszútávon a vesefunkció elvesztéséhez, ESRD-hez vezet, melyben vesepótló kezelés, lehetőségek szerint KTx válik szükségessé. A beültetendő vese optimális állapotának elérése, a hosszútávú graftműködés fenntartása kiemelt jelentőségű a várólistán lévők számának csökkentése és a transzplantált betegek túlélése szempontjából.

Az IRI a veseátültetés során a graftműködés egyik legmeghatározóbb, alloantigéntől függő faktora. Munkacsoportunkban két évtizedes hagyománya van az IRI patomechanizmusát feltáró, a nemi különbségek jelentőségét vizsgáló, a károsodás csökkentésére irányuló kísérleteknek. Korábbiakban kimutattuk, hogy a nőstény állatok védettebbek a renális IRI okozta akut vesekárosodással szemben (AKI), jobb a posztiszkémiás renális perfúzió, enyhébb a strukturális károsodás [207], melyet sok más tényező mellett a nőstények alacsonyabb endothelin-1 expressziója, illetve magasabb NO szintje [237] magyaráz. Leírtuk, hogy nőstényekben a NKA aktivitása is megtartottabb részben a citoszkeletális struktúra enyhébb károsodása miatt [182].

A következőkben csak az elmúlt öt évben született legújabb eredményeink kerülnek bemutatásra, melyben azt vizsgáltuk (i) részt vesznek-e a HSPk a nemi különbség kialakításában (ii) a S1R, mint molekuláris chaperon szerepet játszik-e az IRI folyamatában (iii) protektív-e a S1R agonista FLU kezelés az IRI-vel szemben (iv) KTx során használható-e a FLU a graftműködés javítására. A kísérleteket Dr. Bánki Nóra Fanni, Dr. Hosszú Ádám és Dr. Antal Zsuzsanna korábbi munkatársaimmal végeztük.

V.3.1. Nemi különbségek a S1R változásában IRI során V.3.1.1. Az ösztrogén szerepe a S1R mediált hősokkválasz kialakításában in vitro

17β-ösztradiollal (E2) kezelt HK-2 proximális tubulus sejtekben vizsgáltuk a S1R aktivációját és a hősokk válasz változását. A kezelési dózisokat, tenyésztési körülményeket előkísérletek során viabilitás és proliferációs assaykkel állítottuk be, részletes adatok nem kerülnek bemutatásra.

Bár a S1R fehérje mennyisége azonos maradt az E2 kezelést követően is, a receptor lokalizációja megváltozott. Míg kontroll sejtekben a S1R perinukleáris lokalizációt mutatott, az E2 kezelt sejtekben intracellulárisan és a sejtmagban is jelentős festődést detektáltunk, mely a receptor aktiválódását jelzi. Ezzel párhuzamosan változott a HSF-1 lokalizációja is: E2 hatására a fehérje a sejtmagba transzlokálódott, ami a hősokk választban szerepet játszó gének transzkripcójának növekedésére utal. A S1R antagonista NE100-zal történő kezelés a transzlokációt mindkét fehérje esetében csökkentette.

A HSF-1 aktiválódásával a hősokk válaszban résztvevő fehérjék mennyisége is emelkedett E2 kezelést követően, a HSP72 szintje szignifikánsan, a HSP27 tendenciájában magasabb volt a kontroll csoportnál. Az NE100 megakadályozta az E2-indukált fehérjszint növekedést (*65. ábra*).



65. ábra A Sigma-1 receptor és a hősokk válasz aktiválódása 17β-ösztradiol hatására Bal oldali panel: Sigma-e receptor (S1R) és hősokk faktor (HSF)-1 fluroeszcens immuncitokémia reprezentatív képei kontroll (*Control*), 17β-ösztradiol előkezelt (*E2*) és 17β-ösztradiol és NE100 előkezelt (*E20+NE100*) HK-2 proximális tubulus sejteken. *Zöld*: S1R, *piros*: HSF-1, *kék*: sejtmag. (A piros nyilak a citoplazmában található S1R-t, a fehér nyilak a sejtmagban található HSF-1-t jelölik. nagyítás:100x; lépték: 50 µm), Jobb oldal: S1R b: HSF.-1, c: hősokk fehérje-72 (HSP72), d: hősokk fehérje-27 (HSP27) fehérje szintek, reprezentatív gélképekkel. A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk (átlag±SEM, n=6 well/csoport +p<0,05 vs. K, ++p<0,01 vs. K, ^{SS}p<0,01 vs. E2, NS.: nem szignifikáns) [238].

V.3.1.2. Az ösztrogén szerepe a SIR mediált hősokkválasz kialakításában IRI indukált AKI-ban

IRI-t követően a retenciós paraméterek mindegyik csoportban emelkedtek, T24-re közel tízszeresére is nőttek az értékek, jelezve az AKI kialakulását. Nőstényekben a vesefunkciós értékek mérsékeltebb emelkedést mutattak, mind az Ovx nőstényekhez, mind a hímekhez képest. A funkcionális beszűkülés mellett, súlyos strukturális károsodás jelentkezett, elsősorban a vese kortiko-medulláris állományában. Kiterjedt tubuláris nekrózis, hialinizáció és interstíciális léziók alakultak ki már T2 időpontban, mely T24-re tovább romlott (*66. ábra*).

dc_1685_19 **a**



66. ábra Renális funkcionális (felső panel) és strukturális (középső és alsó panel) változások áloperált (sham), illeve 2 (T2) és 24 (T24) órával IRI után hím, nőstény és ovariektomizált patkányokban. (fehér oszlop: nőstény, fekete: hím, kockás: Ovx, átlag \pm SEM, N =8/csoport, ⁺⁺⁺p<0,001 vs. SHAM; ^{###}p<0,001 vs. T24 I/R nőstény)

		Glomerulus kollapszus	Tubuláris nekrózis	Tubulus hialinizáció	Leukocita infiltráció	Intersticiális lézió	Hisztológiai értékelés szemikvantitatív skála:
	nőstény	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	(glomerulus kollapszus (0-3),
Sham	hím	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	tubulus nekrózis (0-4), tubulus
	Ovx	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	infiltráció (0-3) és intersticiális
T2 I/R	nőstény	1 (0-2) +	1 (0-1)+	1 (0-2)+	1 (1-2)+	0 (0-1)	lézió (0-4)) (medián \pm range.
	hím	2 (0-2)+*	1 (0-2)+	1 (0-1)	1 (0-1)+	1 (0-2)+*	N=8/csoport, $p<0.05$ vs. K
	Ovx	1 (0-2)+	1 (0-1)+	1 (0-2)+	1 (0-2)+	0 (0-1)	*p<0,05 vs. T2 I/R. nőstény;
T24 I/R	nőstény	0 (0-1)	3 (1-4) [§]	2 (1-2)§	1 (1-2)	1 (0-2)	[#] p<0,05 vs. T24 I/R nőstény;
	hím	2 (2-2)#	3 (2-4)§	2 (2-2)§	2 (1-3)# §	3 (0-3) ^{#§}	[§] p<0,05 <i>vs</i> . T2)
	ovx	0 (0-2)	3 (1-4) [§]	2 (1-2)§	1 (1-2)	0 (0-2)	



PAS festett reprezentatív képek. Fekete nyíl glomerulus kollapszus, fehér nyíl nekrotikus tubulus, piros nyíl a hialin halmozódás (Nagyítás: 400x, lépték: 500 µm)

dc_1685_19 <u>V.3.1.3. Nemi különbségek a SIR, pAkt, HSF-1, HSP72, HSP27 és NKA fehérjeszintekben</u>

A renális S1R fehérjeszintje a kontroll nőstényekben a magasabb volt (p=0.057). a hím és az Ovx csoporthoz képest. Míg hímekben és Ovx nőstényekben a S1R mennyisége nem változott, nőstényekben T2-re megemelkedett, majd T24-re visszatért a kiindulási szintre (67. *ábra*).

A pAkt (Ser473) fehérjemennyisége a nőstényekben már kontrollokban is magasabb volt a másik két csoportnál, T2-re még kifejezettebb lett. Hímekben és Ovx-ben a pAkt lassabban és kevésbé emelkedett, maximumát csak T24-ben érte el. Hasonló dinamikát mutatott a HSF-1 és a HSP72: már kontroll nőstényekben jelentősen magasabbak voltak a fehérjeszintek, és az inzultust követően gyorsabban és nagyobb mértékben emelkedtek a hím és az Ovx csoporthoz képest. T24-ben a különbség csökkent, de változatlanul nőstényekben volt a legmagasabb.

A többi fehérjéhez hasonlóan a NKA is magasabb volt nőstényekben már a sham operált kontrollokban is, ez a különbség T2-re tovább növekedett. Bár T24-ben csökkent a fehérje mennyisége, de még továbbra is meghaladta a hímekét. A hímek és az Ovx nőstények csoportjában a NKA számottevően nem változott.

A HSP-27 a többitől eltérően változott. Bár kontrollokban nőstényekben magasabb volt, T2re lecsökkent a hímek/Ovx állatok szintjére. T24-re mindhárom csoportban jelentős emelkedést mutatott, a nőstények fehérjeszintje ismét magasabb volt a másik két csoportnál.



67. ábra S1R-pAkt-HSP-NKA útvonal fehérjéinek változása hím, nőstény és ovariektomizált áloperált (SHAM), illeve 2 (T2) és 24 (T24) órával IRI után A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk. (fehér oszlop: nőstény, fekete: hím, kockás: Ovx, átlag ±SEM, N=8/csoport, *p<0,05 vs. SHAM, *p<0,001 vs. T2; ^{##}p<0,001 vs. T24 I/R nőstény) [238].

V.3.2. SIR agonisták lehetséges protektív hatásai IRI okozta AKI kárososodás csökkentésében V.3.2.1. Az endogén SIR agonista DHEA hatása a renális IRI–t követően

Korábbi eredményeink [182, 207, 239, 240] során megállapítottuk, hogy az alkalmazott szubletális IRI modellben azok az állatok melyek az első posztiszkémiás hetet túlélik, később felépülnek az AKI-ből és a továbbiakban is életben maradnak. Mindezek alapján a posztiszkémiás túlélést az első hét végéig követjük csak.

A DHEA előkezelés javította a hím állatok posztiszkémiás túlélését (medián túlélési idő: 72 vs. 36 óra). A DHEA-előkezelt állatok harmada teljesen felépült, míg a kezeletlen állatok mindegyike elpusztult a posztiszkémiás periódust követő első 75 órában. A renális retenciós paraméterek emelkedése és a hisztológiai károsodás mértéke az összes csoportban alátámasztotta az AKI kialakulását. A kezeletlen csoportban T24-ben a tubulusok 75%-a nekrotikus volt, a kefeszegély teljesen eltűnt és jelentős hialinfelhalmozódást láttunk. A peritubuláris kapillárisátmérők csökkenése jelezte a posztiszkémiás vazokonstrikciót. A DHEA előkezelés csökkentette a vazokonstrikciót, gátolta a proximális tubulus sejtek nekrózisát, segített a kefeszegély integritásának megőrzésében, ami tükröződött a vesefunkció javulásában is (*66. ábra*).



68. ábra A DHEA előkezelés protektív a renális iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodással szemben áloperált (SHAM), vehikulum (I/R) vagy dehidroepiandroszteron DHEA (I/R DHEA) előkezelt csoportokban (A) Posztiszkémiás túlélés. I/R (N=8/csoport), (B-C) Renális retenciós paraméterek 24 órával az I/R károsodást követően (N=6/csoport, átlag \pm SEM) (D) Renális peritubuláris kapillárisok átmérőjének változása két foton mikroszkóppal történt mérés alapján. (átlag \pm SEM, N=3/csoport; ~150 kapilláris/állat), (E-G) PAS festett reprezentatív képek, 400x nagyítás, lépték:100 µm, fekete nyíl: ép kefeszegély, rövid fekete nyíl: nekrotikus tubulus, vékony fekete nyíl: hialin felhalmozódása a tubulusban, Tubulus károsodás szemikvantitatív értékelelése (0-4), (N=6/csoport, medián \pm range, +p<0,05 vs. SHAM; *p<0,05 vs. T24 I/R) [241].

V.3.2.2. A FLU renoprotektív hatású renális IRI-t követően

A S1R agonizmus protektív hatásának alátámasztására következőkben a DHEA-hoz képest nagyobb affinitású szelektív agonista, FLU előkezelést alkalmaztunk. A FLU kezelt (I/R F) csoport posztiszkémiás túlélése közel másfélszerese volt a vehikulum (I/R), illetve FLU+NE100 antagonistával (I/R FN) kezelt csoportoknak (medián túlélési idő: 67 vs. 36 ill. 49 óra,). Az I/R F állatok harmada teljesen felépült, míg az I/R, illetve I/R FN állatok mindegyike elpusztult a posztiszkémiás periódus első 70 órájában. A FLU javította a vesefunkciót, a túlélő állatok (T168 I/R F) retenciós paraméterei az első hét végére csaknem normalizálódtak. A tubulusok károsodására is jellemző szelektív AST emelkedés is a sham operált csoport értékére csökkent vissza a T168 I/R F csoportban (*69. ábra*). A fenti paraméterek a T24-ben is alacsonyabbak voltak a FLU-kezelt állatokban (T24 I/R F); a renoprotektív hatást az NE100 (T24 I/R FN) felfüggesztette.

A hipoxiára indukálódó és a sejtregenereatív folyamatokban aktívan résztvevő *Hif-1α* mRNS expresszió a reperfúzió 2 órájában hússzorosára nőtt (T2 I/R), az emelkedés a FLU kezelt csoportban volt a legkifejezettebb (T2 I/R F). A tubuluskárosodásra specifikus *Ngal* és *Kim-1* mRNS szintek jelentősen nőttek, az összes csoportban T24-re, a FLU kezelt állatokban kisebb mértékben, ami enyhébb tubuláris károsodást jelez.



69. ábra A FLU előkezelés protektív a renális iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodással szemben áloperált, (SHAM) vehikulum (I/R), fluvoxamin (I/R F) vagy fluvoxamin+NE100 (I/R FN) előkezelt csoportokban (A) Posztiszkémiás túlélés. I/R (B-C-D) Renális retenciós paraméterek és aszpartát-aminotranszferáz (AST) 24 órával ill. 168 órával az I/R károsodás után (E-G) Renális *Hif-1 \alpha*, *Kim-1* és *Ngal* mRNS expresszió *Gapdh*-ra normalizálva. (N=8/csoport, átlag ± SEM, ⁺p<0,05 vs. SHAM; ^{*}p<0,05 vs. T24 I/R; [§]P<0,05 vs. T24 I/R F) [241]

V.3.2.3. A FLU mérsékli az IRI indukálta szisztémás gyulladást

Az IRI indukálta szisztémás gyulladást jelezte a magasabb fehérvérjsejtszám és egyes proinflammatorikus citokinek megemelkedett renális fehérjeszintje. A FLU kezelés a fehérvérsejtszámot 30%-kal, az IL-1α és IL-6 mennyiségét 70%-kal csökkentette. A TNF-nem változott, míg az anti-inflammatorikus IL-10 15%-kal nőtt a FLU kezelés hatására (14. táblázat).

	SHAM	T24 I/R	T24 I/R F	T24 I/R FN
IL-1α (pg/mL)	0.17±0.16	$58.7 \pm 16.3^+$	16.1±4.82 [*]	11.4±6.33
IL-6 (pg/mL)	0.00±0.00	141±14.9 ⁺	29.6±3.36*	32.4±10.4
TNF-α (pg/mL)	106±2.07	138±16.4	149±8.67	135±8.76
IL-10 (pg/mL)	75.6±1.61	98.0±5.87 ⁺	113±7.95 [*]	86.6±2.54 [§]
IL-4 (pg/mL)	8.74±1.11	9.88±0.80	10.6±0.11	10.1±0.15

14. táblázat A FLU előkezelés csökkenti a gyulladást renális iszkémia/reperfúziós (IR) károsodást követően vehikulum (I/R), fluvoxamin (I/R F) vagy fluvoxamin+NE100 (I/R FN) előkezelt csoportokban (N=6/csoport, átlag \pm SEM, +p<0,05 vs. SHAM; *p<0,05 vs. T24 I/R; §p<0,05 versus T24 I/R F)

V.3.2.4. A FLU csökkenti a vese posztiszkémiás szöveti sérülését

A vese szöveti szerkezete a korábbiakhoz hasonló képet mutatott mind a hagyományos PAS festett mintákon, mind két-foton mikroszkóppal vizsgálva. Az IRI következtében masszív leukocita infiltrációt, tubuláris nekrózist, a kefeszegély pusztulását és hialin felhalmozódást láttunk. A FLU-val kezelt csoportban a tubuláris nekrózis jóval enyhébb volt, a kefeszegély helyenkét megtartott maradt 24 órával az IRI után. A T168 I/R csoportban a posztiszkémiás tubuláris nekrózis és a kefeszegély sérülése felére csökkent, megkezdődött a tubulusok regenerációja (*70. ábra*).





70. ábra A FLU előkezelés csökkenti a vese struktúrális sérülését renális iszkémia/reperfúziós (IR) károsodást követően vehikulum (I/R), fluvoxamin (I/R F) vagy fluvoxamin+NE100 (I/R FN) előkezelt csoportokban (A-E) Felső panel: Reprezentatív PAS-festett szövettani képek (A) áloperált (SHAM), (B) T24 I/R F, (C) T168 I/R F, (D) T24 I/R és (E) T24 I/R FN patkányokban. fekete nyíl: ép kefeszegély, rövid fekete nyíl: nekrotikus tubulus, vékony fekete nyíl: hialin felhalmozódása a tubulusban, (F) Tubulus károsodás szemikvantitatív értékelelése (0-4), (medián \pm range, N=6/csoport; 200x nagyítás, lépték: 100 µm, ${}^+p<0,05$ vs. SHAM; ${}^*p<0,05$ vs. T24 I/R; ${}^sp<0,05$ vs. T24 I/R) Alsó panel: Reprezentatív 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 µm) [241].

V.3.2.5. A FLU S1R-mediált NO termelődést okoz a proximális tubulus sejtekben

Bár a S1R mennyisége nem változott sem FLU, sem H₂O₂ kezelést követően, a lokalizációja a normál és az oxidatív stresszt szenvedett proximális tubulus sejtekben különböző. Míg kontroll körülmények között a S1R perinukleárisan helyezkedett el, mind ligandkötés (FLU), mind károsító noxa (H₂O₂) hatására kihelyeződött és a receptor az egész intracelluláris térben detektálható volt immuncitokémiai festéssel és szubcelluláris frakcionálást követő western blot vizsgálattal egyaránt.

FLU kezelést követően a peNOS (Ser1177) fehérjeszintje mind kontrollokban (F) mind oxidatív stresszben emelkedett (H₂O₂ F), az NE100 felfüggesztette ezt a hatást. Az nNOS a proximális tubulusokban nem volt kimutatható egyik csoportban sem.

A S1R eNOS termelésben betöltött direkt hatását S1R csendesített sejtekben végzett kísérletekkel erősítettük meg. A géncsendesített sejtekben a S1R fehérjeszintje 70%-kal csökkent, és alacsonyabb volt a peNOS mennyisége is.

Az Akt az NO szintézisének egyik legfontosabb regulátora, ennek igazolására upstream (Akt IV) és downstream (Akt VIII) inhibitort alkalmaztunk. Az Akt gátlása megakadályozta a FLU indukálta eNOS emelkedést és NO termelést a proximális tubulus sejtekben, mely bizonyítja közvetlen szabályozó szerepét a S1R –NO hatás kialakításában (*71. ábra*).



71. ábra A S1R lokalizációjának és jelátviteli útjának változása oxidatív stressz illetve FLU hatására

Felső panel: Reprezentatív fluoreszens immuncitokémia (A) kontroll, (B) H2O2 (C) FLU és (D) H2O2+FLU kezelt HK-2 sejtekben (Sejtmag (kék), S1R (zöld). 100x nagyítás lépték=5 μ m), (E) S1R fehérjemennyisége kontroll (C) FLU (F), FLU+NE100 (FN), H2O2, H2O2+FLU (H2O2 F) és H2O2+FLU+NE100 (H2O2 FN) kezelést követően; (F) S1R fehérjemennyiség citoplazma/membrán, (G) illetve sejtmag/membrán arány az egyes kezelési csoportokban. Reprezentatív gélképek (N=6 well/csoport, *p<0,05 vs. C, [§]p<0,05 vs. H2O2), (H) peNOS (Ser1177) fehérjemennyiség. +p<0.05 vs. C; §P<0.05 vs. F; *p<0.05 vs. H2O2; [§]p<0.05 vs. H2O2 F). (I) S1R és (J) peNOS fehérjemennyiség S1R géncsendesített HK-2 sejtekben siRNA kezelt negatív kontrollokhoz viszonyítva (Neg. C) +p<0,05 vs. Neg.C; (N=6 well/csoport). (K) pENOS fehérjeszintek és (L) nitrit termelés FLU (F), FLU+NE100 (FN), FLU+AktVIII inhibitor (F+Akt VIII) és FLU+AktIV inhibitor (F+Akt IV) csoportokban, (átlag ± SEM, N=6 well/csoport, *p<0,05 vs. F) [241].

V.3.2.6. A FLU a SIR – NO mediált vazodilatációval javítja a renális perfúziót IRI -ben

Két foton mikroszkópiával *in vivo* vizsgáltuk a peritubuláris kapillárisok érátmérőjének változását 30 perccel FLU beadását követően. Az előkezelés hatására a peritubuláris kapillárisok érátmérője nőtt, ezzel párhuzamosan emelkedett a peNOS mennyisége és az NO termelődés. A vazodilatációt a NOS gátlókkal (non-szelektív L-NAME, szelektív nNOS gátló 7-NI, szelektív eNOS gátló L-NIO) történő kombinált kezelés felfüggesztette. A leghatékonyabb az eNOS gátlása volt.

Hasonló változást detektáltunk IRI károsodást követően is: FLU hatására nőtt az NO termelődés és ezzel párhuzamosan fokozott peritubuláris kapilláris dilatációt mértünk 24 órával az iszkémiás beavatkozást követően. A S1R agonista NE100, és a különböző NOS gátlók felfüggesztették a FLU hatását, ami arra utal, hogy a FLU hatása – legalábbis nagyrészben - S1R mediált és NOS dependens.

Tovább vizsgálva a FLU jelátviteli útvonalakat, mértük a S1R, pAkt (Ser473), peNOS (Ser1177) és nNOS fehérjeszinteket 30 perccel a beadást követően kontrollokban, illetve IRI után is. A FLU már 30 perc múlva növelte a pAkt és peNOS mennyiségét, míg a S1R és az nNOS változatlan maradt. Az IRI inzultust követő 24 órában már mindegyik fehérje szintje megemelkedett, jelezve, hogy az eNOS foszforilálódása és termelődése szinte azonnal a S1R aktivációt követően megtörténik, mígy az Nnos később, a reperfúzió alatt kezd szintetizálódni. A NOS szintézis növekedésével párhuzamosan, megnőtt a termelt NO mennyisége is (*69 ábra*).

dc_1685_19



72. ábra A FLU a S1R –NO mediált vazodilatáción keresztül javítja a renális perfúziót IRI kapcsán (A) peritubuláris kapillárisok érátmérőjének változása 30 percel FLU (T30' F), FLU+NE100 (T30' FN), FLU+non-szelektív NOS gátló L-NAME (T30' F+NAME), FLU+ szelektív eNOS gátló L-NIO (F+NIO) és FLU+ szelektív NOS nNOS gátló 7-NI (F+7-NI) kezelést követően áloperált (SHAM) patlányokban (átlag ± SEM, N=3/csoport, ~150 kapilláris/állat, ${}^{+}p < 0.05 vs. SHAM; {}^{\$}p < 0.05 vs. T30' F$); (B) A peritubuláris kapillárisok érátmérőjének változása 24 órávai az iszkémiás inzultus után (+N=3/csoport, ~150 kapilláris/állat) (C) Szérum nitrit koncentráció Renális (D) pAkt (Ser473), (E) peNOS (Ser1177) and (F) nNOS fehérje szintek FLU- (T30' F) és FLU+NE100 (T30' FN) kezelt áloperált állatokban, illetve 24 órávai IRI után. Felső panel reprezentatív gélképek. A fehérjemennyiségeket Ponceau-S-re normalizáltuk (+ $p < 0.05 vs. SHAM; {}^{\#}p < 0.05 s. T30' I/R F; {}^{*}p < 0.05 s. T24 I/R; {}^{\$}p < 0.05 s. T24 I/R F; N=57/csoport) [241]$

V.3.3. S1R agonisták alkalmazása vesetranszplantáció során

A fenti kísérletek bizonyították, hogy a S1R agonista kezelés renoprotektív hatású az IRI károsodással szemben. Tekintettel arra, hogy az IRI a veseátültetés során a DGF, illetve a hosszútávú graftműködés szempontjából kiemelten fontos, továbbiakban azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a beültetendő vese S1R agonista tartalmú oldatban történő tárolása a KTx sikerét.

<u>V.3.3.1. A SIR agonista tartalmú prezervációs folyadékban történő tárolás csökkenti a a tárolás alatt</u> elszenvedett hideg iszkémiás károsodást

Kontroll állatok veséit először 2 percen keresztül perfundáltuk 0°C-os Custodiol HTK vagy Custodiol + 10 μ M FLU, Custodiol + 10 μ M SA-4503 vagy Custodiol + 10 μ M PRE084 tartalmú prezervációs oldattal, majd ezekben az oldatokban jégen 2, 3, 8 ill. 24 óráig történő tárolást követően értékeltük a károsodásokat.

Mindegyik hatóanyag mérsékelte a hideg iszkémia alatt létrejövő szöveti sérülést. A HE történő festést az összes csoport esetében elvégeztük a struktúra általános megítélésére. A tubuláris dilatáció meghatározását PAS festett metszeteken értékeltük. Már a HE-nal festett metszeteken látszott, hogy jóval kifejezettebb a veseszövet károsodása a kezeletlen csoportokban, a különbség a S1R agonistát tartalmazó és a csak Custodiol-ban tárolt vesék szöveti szerkezete között az idő előrehaladtával egyre nagyobb lett. A PAS festett metszeteken kiértékelt tubuláris dilatáció mértéke nagyobb volt a kezeletlen csoportban és a tárolás 8-ik órájáig folyamatosan romlott. Ezzel szemben a S1R agonistát tartalmazó prezervációs folyadékban tárolt szervek vesékben a tubuláris károsodás jelenősen kisebb volt, az idő elteltével a kezdeti dilatáció nem romlott. Kiemelendő, hogy a tubulus dilatáció mértéke még 24 óra elteltével sem volt annyira kifejezett, mint a hatóanyagot nem tartalmazó csoportban már 2 óra után (*73. ábra*).



73. ábra A S1R agonisták mérsékelik a hideg iszkémiás szöveti károsodást fluvoxaminnal (FLU), SA-405 (SA), ill. CP történő tárolás alatt CP: hideg perfúzió. Reprezentatív HE és PAS festett szövettani képek (nagyítás 200x, lépték: 100 μ m, N=6 csoport, átlag ± SEM *p<0,05 vs. 2h CP, **p<0,01 vs.2h CP; ***p<0,001 vs. 2h CP; #p<005 vs. 3h CP, ###p<0,01 vs. 3h CP, \$\$\$p<0,001 vs. 8h CP; \$\$\$p<0,01 vs. 24h CP)

A különböző S1R agonistákkal kiegészített prezervációs folyadékban történő tárolás a FLU csoportban csökkentette a hideg iszkémia indukálta apoptózist (74. ábra)



74. ábra A S1R agonisták mérsékelik a hideg iszkémia okozta apoptózist fluvoxaminnal (FLU), SA-405 (SA), ill. CP történő tárolás alatt CP: hideg perfúzió. (Reprezentatív Tunel festett szövettani képek, nagyítás 200x, lépték=100μm, N=6 csoport, átlag± SEM, *p<0,05 vs. 2h CP; #p<0,05 vs. 3h CP; \$p<0,05 vs. 8h CP)

V.3.3.2. A SIR agonista kezelés javítja a beültetett graft állapotát KTx során

Az állatok veséjét Custadiol vagy Custadiol +10 μM S1R agonista FLU, vagy 10 μM SA-4503 (SA) tartalmú oldattal történő 2 órás perfundálás után visszaültettük az állatba (KTx). 24 óra múlva az állatokat leöltük. A KTx-t követő beszűkült vesefunkciót a S1R agonisták javították. A hagyományos retenciós paraméterek közül a BUN-t csak az SA-4503 csökkentette T24-ben. A tubuláris károsodásra specifikusabb AST, illetve *Kim-1* és *Ngal* mRNS expressziója mindkét kezelési csoportban alacsonyabb volt, mint a csak Custadiolban tárolt graftot kapó állatokban. A szérum cytstatin-C szintben nem volt különbség a csoportok között.

A hideg iszkémiás károsodás következtében jelentősen tubuláris dilatációt figyeltünk meg, a tubulusok lumene csaknem háromszorosára nőtt. A struktúrális károsodást mindkét S1R agonista mérsékelte. KTx-et követően kiterjedt apoptotikus elváltozásokat detektáltunk mindegyik csoportban, a Tunel pozitív sejtek száma a FLU tartalmú prezervációs folyadékban tárolt vesében minimálisan kevesebb volt, csak Custadiolt tartalmazó oldatban mint a tárolté. Az átültetést követően a proinflammatorikus citokinek szintje a graftban emelkedett, a FLU az $II1\alpha$, *Il6* szintjét és *IL10* szintjét csökkentette, a *TNFα* nem változott (75. *ábra*).



75. ábra Veseautotranszplantációt (ATx)-et követően a S1R agonisták protektívek a renális funkionális, struktúrális és gyulladásos károsodásokkal szemben (A) Szérum kreatinin, (B) karbamid – nitrogén, (C) aszpartát aminotranszferáz (AST), (D) cystatin C szintek, (G, I) tubulus lumen dilatáció (PAS), (J,H) apoptózis mértéke. Renális (E) *Kim-1* és (F) *Lcn2* és (K) proinflammatoriukus citokinek mRNS változása 24 órával az ATx-et követően csak Custadiolban fluvoxaminnal (ATxFLU) ill. SA-405 (ATxSA) prezervációs folyadékban történő tárolás alatt. Az mRNS expressziót 18S RNS-re normalizáltuk. (N=6/csoport, átlag \pm SEM) ⁺⁺⁺p<0,001 vs. SHAM; *p<0,05 vs. ATx VEH; **p<0,01 vs. ATx VEH)

Vizsgálatainkat jelenleg is folytatjuk, annak tanulmányozására, hogy a donor/recipiens kezelése jelent-e további előnyt, a prezervációs hőmérséklet áramlás változtatása befolyásolja-e a kimenetelt. A dolgozatban itt bemutatott eredmények képezik a S1R agonista prezervációs folyadék renoprotekív hatását igazoló, nemzetközi fázisban lévő szabadalmunk alapját. A kísérleteket Dr. Hosszú Ádám és Dr. Antal Zsuzsanna munkatársaim és Lakat Tamás PhD hallgatóm végzi.

dc_1685_19 VI. MEGBESZÉLÉS

DIABÉTESZ ÉS DEPRESSZIÓ

A cukorbetegek több mint 40%-a depressziós tünetekkel küzd, ez rontja a metabolikus kontrollt és a betegek terápiahűségét, növeli a halálozást és a DM-indukálta szövődmények kialakulását [242, 243]. Bár a két betegség együttállásának a pszihoszociális tényezőkön kívüli, egyéb okait több évszázada felvetették, csak az elmúlt egy-két évtizedben kezdtek komolyabban foglalkozni a kérdéssel. Cukorbetegekben elsősorban SSRI-típusú készítményeket alkalmaznak a kedvező klinikai tapasztalatok alapján [244], azonban kevés adat áll rendelkezésre a hatékonyságuk molekuláris mechanizmusairól.

Munkacsoportunk vizsgálta elsőként a depresszióra jellemző viselkedést krónikus DM esetén. A korábbi tanulmányok a tünetegyüttes megjelenését csak a DM kezdeti szakaszában (<1 hó) értékelték. Kimutattuk, hogy DM héthetes fennállását követően depresszió-szerű viselkedésmintázat alakul ki a patkányokban, jelentősen emelkedik a lebegés időszázaléka. A lebegés a Porsolt-teszben egyfajta passzív megküzdési (reménytelenség) mechanizmusként értelmezendő [245]. A gyógyszerek antidepresszáns hatásának tesztelésekor korábbiakban csak a lebegést vették figyelembe, majd kiderült, hogy az egyes szerek (SSRI-ok, noradrenalin visszavételt gátlók) eltérően befolyásolják az egyes mobilitási paraméterek időtartamát. A szerotonin átvitel fokozása főként az úszás időszázalékát növeli, míg a noradrenalin neurotranszmisszió emelkedése a kapálózás idejét hosszabbítja meg [246].

T1DM állatkísérletekben általában csak az immobilitás idejét határozzák meg, az aktív szakasz mozgásmintázatait csak két tanulmány részletezi. Nadeem és mtsai által végzett kísérletekben 2 hetes DM alatt csak az úszási paraméter ideje csökkent [247]. Ezzel szemben Caletti kutatásaiban 4 hetes DM során az úszás és a kapálózás ideje is alacsonyabb volt, míg búvárkodást egyáltalán nem tudtak detektálni [248]. Saját eredményeinkben, 7 hetes DM után mind az úszás, mind a kapálózás ideje csökkent, a búvárkodás nem változott. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy minél hosszabb ideje áll fenn a hiperglikémia, mint tartós stressz és a hozzá társuló depresszió, annál erőteljesebb a passzív megküzdés (lebegés) és ezzel párhuzamosan csökken az aktív copying (úszás és kapálózás). A búvárkodás fiziológiás körülmények között is a legkevésbé előforduló mozgásmintázat, megjelenése nem konzekvens, statisztikailag értékelhető következtetés levonására nem alkalmas.

Ismert, hogy az SSRI-ok mérséklik a depresszió-szerű viselkedést krónikus stressz által kiváltott modellekben [249], azonban cukorbetegségben nagyon kevés experimentális adat hozzáférhető az SSRI-ok antidepresszáns hatásáról. FLU terápiát egy tanulmányban használtak, ahol kéthetes T1DM során, egyszeri FLU adása antidepresszáns hatást nem eredményezett [250].

Kísérleteinkkel elsőként igazoltuk, hogy a hosszútávú 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. Korábbiakban hasonló vizsgálat DM-ben nem történt, így az eredményeinket csak más modellekkel tudjuk összehasonlítani.

Egészséges, ivaréretlen patkányokban a krónikus FLU adagolás hatástalan volt [251]. Ovariektomizált állatokban az úszás időszázaléka emelkedett egyszeri kezelésre, azonban a kapálózás nem változott, míg krónikus enyhe stressz okozta depresszióban a FLU növelte mind a kapálózás, mind az úszás idejét [252, 253]. Sugimoto és mtsai kísérletei során a FLU kezelés DBA/2 és BALB/c egértörzsekben enyhítette a depressziószerű tüneteket, azonban ICR, ddY vagy C57BL6 állatokban hatástalan volt [254]. Mindezek arra utalnak, hogy az antidepresszáns hatás kialakulását számos tényező (állatmodell, törzs, nem, kor, a kezelés időtartama) befolyásolhatja.

Az úszásteszt értékelése során fontos, hogy valóban antidepresszáns hatást látunk-e, vagy az élénkebb mozgásmintázat az állatok általános állapotjavulásának következménye. Ez a lokomotoros aktivitást vizsgáló porond teszttel eldönthető. Kísérleteinkben 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 hatását.

A depresszió kialakulását DM-ben a tímúsz és a mellékvese struktúrális változásai kísérik. A hiperglikémia, mint krónikus stressz a HPA-tengely túlműködését eredményezi, ami a CRH termelődés és/vagy a negatív visszacsatolás megszűnése révén – a mellékvese hipertrófiájához vezet. A timociták pusztulásában a hiperglikémia által indukált gyulladási reakciók és a fokozott glükokortikoid termelődés játssza a fő szerepet [216, 255]. A FLU kezelés a neuroendokrin szervek változásait nem akadályozta meg. Más (nem DM) tanulmányokban enyhe stressznek kitett patkányokban a fluoxetin kezelés csökkentette mellékvese-hipertrófiát, illetve gátolta a tímusz súlycsökkenését [256, 257], de ezekben a vizsgálatokban a fluoxetint a kísérlet elejétől, preventív jelleggel adták. Esetünkben a kezelést a DM 5 hetes fennállását követően kezdtük el és azt feltételezzük, hogy a szervi elváltozások visszafordítására a 2 hetes kezelési periódus nem elegendő. Erre utalnak Kioukia-Fougia kísérletei is; triciklusos antidepresszáns kezelés csak akkor volt hatékony a szervek méreteit illetően, ha a kezelést a kísérlet elejétől kezdték [258]. Tekintettel arra, hogy FLU-t mindeddig az irodalomban nem alkalmaztak, megalapozott v az a feltevésünk, hogy a FLU hatása/hatásmechanizmusa részben eltérhet a többi SSRI-tól.

Az eltérő hatékonyság egyik magyarázata lehet, hogy az antidepresszánsok közül néhány, így számos SSRI aktiválja a S1R-t, de közülük a FLU kötődik a legnagyobb affinitással a receptorhoz (Ki=36 nM, fluvoxamine > sertraline > fluoxetine > citalopram > paroxetine) [259]. Klinikai

vizsgálatok nincsenek azt illetően, hogy szelektív S1R agonistákkal csökkenthető-e a depressziós tünetegyüttes, de néhány állatkísérletes adat rendelkezésre áll. Szelektív S1R agonista SA4503 illetve SKF-10,047 dózisfüggő módon csökkentette az immobilitás idejét az úszástesztek során antagonista NE100 adása felfüggesztette a hatást [260]. Sugimoto és mtsai depresszió genetikai modelljében mutatták ki, hogy egy másik S1R antagonista (BD1047) adása szintén megakadályozza a FLU antidepresszáns hatásának érvényesülését [261]. Kísérleteinkben a S1R antagonista NE100 felfüggesztette a FLU hatását, ami szintén megerősíti, hogy az antidepresszáns hatás – legalábbis részben – S1R mediált.

DM indukált depresszióban munkacsoportunk igazolta először a FLU S1R-BDNF útvonalon keresztül kifejtett antidepresszáns hatását, illetve elsőként detektáltuk az egyes BDNF formák változását az agyszövetben. Kimutattuk, hogy a vizsgált agyi régiókban, mind az össz, mind az izoforma-specifikus BDNF fehérjék szintje megemelkedett, míg az mRNS expresszió nem változott. Fujimoto és mtsai szintén leírták, hogy specifikus S1R agonista kutamezin növelte a BDNF szintjét, az mRNS transzkripció serkentése nélkül [107]. Mindezek alapján úgy gondoltuk, hogy a S1R-nak a BDNF poszttranszlációs módosulásában lehet szerepe, az átalakító enzimek vagy a szekréció serkentése révén. Későbbi kísérleteinkben már ezt a folyamatot is részletesen vizsgáltuk.

A FLU DM-ben történő alkalmazását ismert vagy feltételezett mellékhatásai korlátozhatják. Krónikus SSRI kezelés során az egyik leggyakoribb a hepatotoxicitás. Kísérleteinkben a FLU nem rontotta a májenzimeket, ez alátámasztja azt a klinikai tapasztalatot, hogy a FLU a legkevésbé hepatotoxikus szer az SSRI-ok között [262].

Egyes klinikai esettanulmányok arról számolnak be, hogy az antidepresszáns készítmények befolyásolják a szénhidrátanyagcserét, hiperglikémizáló, esetenként hipoglikémizáló hatásúak lehetnek. Kísérleteinkben a FLU sem a vércukor-, sem a fruktózamin szintet nem befolyásolta. Az irodalom összesen két adatot említ. Yamada és msai egészséges egereknek adott egyszeri FLU kezelést követően átmenetileg magasabb vércukorszintet detektáltak [263]. T1DM-ben nincs adat, T2DM-ben egyetlen depresszióban szenvedő nő kapcsán számoltak be a FLU kezelés vércukoremelő hatásáról, mely az antidepresszáns elhagyása után visszaállt az inzulinnal beállított eredeti vércukorértékre [264]. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a FLU kezelés DM-ben szoros vércukorkontroll mellett, biztonsággal adható.

A lipoprotein metabolizmus zavara a kardiovaszkuláris mortalitás független rizikótényezője [265]. A klinikai megfigyelésekkel összhangban [266, 267], igazoltuk, hogy a FLU csökkenti a DM-indukált hiperlipidémiát. A FLU lipidcsökkentő hatása független a szerotonin visszavétel gátló hatásától, ugyanis más SSRI, pl. a citalopram emeli a szérum triglicerid szintet [268]. Eredményeink

arra utalnak, hogy a hatás hátterében egyrészt a S1R agonizmus állhat, ugyanis az NE100-zal kezelt csoportban nem csökkentek a vérzsírok, de a molekuláris hátteret nem vizsgáltuk.

Első kísérletsorozatunkat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy T1DM-ben a cukorbetegség depresszióra jellemző viselkedést és neuroendokrin változásokat indukál, melyek hátterében a S1R - BDNF jelátviteli út szerepe feltételezhető. A FLU antidepresszáns hatásában részben a S1R aktivációja vesz részt.

A RAASi cukorbetegségben mutatott pleiotróp (antihipertenzív, nefroprotektív) tulajdonsága mára már jól ismert jelenség. Bár hipertóniás állatkísérletes és humán adatok egyaránt beszámolnak a RAASi antidepresszív hatásáról, DM kapcsán alig van adat. T1DM-ben szenvedő közel ezer betegen végzett vizsgálat szerint, azok, akik a társuló veseszövődmények miatt RAASi kezelést kaptak, kisebb dózisú antidepresszánst (SSRI vagy monoamino-oxidáz gátlót) igényeltek [269]. Az egyetlen állatkísérletes vizsgálatban telmizartánnal végzett három hetes kezelés antidepresszánst hatású volt STZ-indukált T1DM korai szakaszában [270].

Kísérleteinkben elsőként mutattuk ki a RAASi-k antidepresszáns tulajdonságát krónikus T1DM-ben, melyet igazolt, hogy az immobilitás a RAASi csoportokban csökkent. Az aktív szakasz egyes mintázatainak vizsgálatakor csak a ramipril volt hatékony és csak az úszási paraméter tekintetében. Feltételezzük, hogy az egyes RAASi csoportok antidepresszáns hatása – az általunk vizsgált jelátviteli útvonalakon kívül is – 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 hiányként" érzékeli, ezért a HPA-tengely aktivitását növeli. Mindezek miatt a depresszió klinikai kezelésében talán nem az MR antagonisták az ideális szerek.

A vaszkuláris hipotézis alapján, melyet *in vivo* SPECT-MRI vizsgálataink is megerősítettek, DM-ben az endotelin-1 és az aktiválódott RAAS lokális vazokonstrikciót eredményez és csökken az agyi véráramlás. Kísérleteinkben a RAASi-k sem a véráramlást, sem az eNOS/nNOS útvonal enzimeit 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.

A RAAS aktiválódása számos neuropszihiátriai betegségekben (pl. Alzheimer- kór, depresszió) és DM-ben is összefüggésbe hozható a neurodegeneratív és a gyulladásos folyamatok erősödésével. Az ANGII hatására fokozódó proinflammatorikus válasz jól ismert jelenség. Kevés a mineralokortiodokra vonatkozó irodalom, egy cikkben írják le, hogy az aldoszteron növeli a proinflammatorikus citokinszinteket depresszióban [271]. Kísérleteinkben a DM állatokban detektált

fokozott CLINME-TSPO felvétel a mikroglia aktivációját jelzi, melyet a hippokampuszban NF-κBmediált gyulladásos válasza kísért. A DM-ben emelkedett *Il1a*, *Il6* és *Tnf* szinteket a RAASi csökkentették [272]. Hasonló vizsgálatok eddig nem történtek, de LPS indukált gyulladásos és hipertóniás modellekben kimutatták, hogy az ARBk csökkentik az asztrociták és a mikroglia aktivációját [273, 274]. Eredményeink elsőként írják le, hogy mindegyik RAASi, az ACEi, ARB és MR antagonisták a DM-ben jelentkező neuroinflammáció mérséklésével a depressziós tünetek csökkentésének új lehetőségét jelenthetik a jövőben.

A proinflammatorikus *Il1a* szint emelkedése LPS-indukált modellben csökkentette a BDNF szintet és kognitív zavarokat okozott, a tüneteket a telmizartán, és az ACEi perindopril adása mérsékelte [275, 276]. Depressziós modellben vagy DM-ben a BDNF jelátvitel változását mi vizsgáltuk elsőként. Kimutattuk, hogy az összes RAASi megakadályozza a DM-indukált BDNF csökkenést. Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy RAASi kezelések nem a DM által aktivált mikroglia, hanem az asztrociták BDNF termelődésének növelésén keresztül fejtik ki protektív hatásukat. Ez érdekes, új megfigyelés, az irodalom a neuronokat és a mikrogliát tekinti a BDNF elsődleges termelési helyének.

Mivel mind a FLU-val végzett korábbi kísérleteink, mind az irodalmi adatok alapján depresszióban a BDNF szintje a prefrontális kéregben és a hippokampuszban azonosan változik, a RAASi szerek hatásait molekuláris szinten már csak a hippokampuszban vizsgáltuk. A BDNF érési folyamata során intracelluláris és extracelluláris hasító enzimek szintetizálják az éretlen (pro) formából az aktív, érett BDNF alakot, mely a TrkB-ERK-CREB útvonalon keresztül segíti az anti-apoptotikus útvonalakat. Figyelemreméltó eredményünk, hogy az egyes RAASi kezelések eltérő módon befolyásolják az átalakító enzimek expresszióját.

Míg az ACEi az MMP3, az ARBk mindkettő, az MR antagonisták az intracelluláris furin szintézisét segítették. A hasítóenzimek aktiválása, akár a RAASi kezelés potenciális targetje is lehet a jövőben és felveti a kombinációs terápia szinergista hatásának lehetőségét az antidepresszáns hatékonyság növelése érdekében.

Összességében igazoltuk, hogy a DM-hez társuló depresszió patomechanizmusában a proapoptotikus útvonal kevésbé jelentős és a RAASi antidepresszáns hatása is független a prekurzor BDNF - p75Ntr -JNK -Bax szignáltranszdukciós útvonaltól. Kimutattuk továbbá, hogy mindegyik RAASi növeli a hippokampuszban a TrkB - Erk - CREB - Bcl2 jelátviteli útvonal fehérjéinek mennyiségét, elősegítve az idegsejtek túlélését, regenerálódását és a szinapszisok formálódását. A mechanizmusokat a 76. *ábra* összegzi.



73. ábra A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) gátlószerek feltételezett hatásmechanizmusa DM-hez társuló depresszióban (BDNF – brain derived neurotrophic factor)

Eredményeink releváns új adatokkal szolgálnak a cukorbetegséghez társuló depresszió közös patomechanizmusának megértéséhez, alátámasztják a neuroinflammáció és BDNF jelátviteli útvonal jelentőségét a komorbiditás kialakításában, illetve új megvilágításba helyezik a S1R agonisták és RAASi alkalmazását a depresszió jövőbeli terápiájában.

DIABÉTESZES VESEKÁROSODÁS KIALAKULÁSÁNAK ÚJ PATOMECHANIZMUSAI ÉS KEZELÉSI LEHETŐSÉGEI

A cukorbetegekben jelentkező depresszió nemcsak a szénhidrátanyagcsere zavarát súlyosbítja, de jelentősen növeli a szövődmények gyakoriságát. A DM következtében létrejövő számos társbetegség közül, munkacsoportunk részletesen a DKD patomechanizmusát és új kezelési lehetőségeit vizsgálta *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

A proximális tubulusokban, illetve a renális fibroblasztokban expresszálódó RAAS komponensek jelenléte még nem teljesen tisztázott. Az *in vivo* aktiválódó komplex szabályozási folyamatok és számtalan visszacsatolási mechanizmus miatt fontos hangsúlyozni, hogy az *in vitro* eredmények extrapolálhatósága igen limitált, különösen annak fényében, hogy az adatok nagyban függnek a kísérleti körülményektől és kezelési protokolloktól.

Tekintettel arra, hogy kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a RAAS és a proximális tubulus sejtek, még kevesebb a fibroblasztok vonatkozásában, első lépésben azt vizsgáltuk, hogyan változtatja a hiperglikémia, illetve az egyes RAASi terápiák a RAAS rendszer elemeinek expresszióját. Az irodalmi adatokkal összhangban igazoltuk, hogy hiperglikémia hatására nő a proximális tubulus sejtek angiotenzinogén, renin [272] és AT1R expressziója [277], míg az ACE és szintje nem változik. Ezzel szemben a fibroblasztokban sem a magas glükóz, sem a kezelések nem változtatták az egyes komponensek mennyiségét.

A krónikus hiperglikémia okozta glükotoxicitás és a fokozott RAAS aktiváció két kulcsfontosságú patognomikus tényező. A vesekárosodás megelőzésében a szoros vércukor-kontroll mellett, az ajánlásokban mikroalbuminúria esetén szerepel a RAASi (ACEi vagy ARB) adása. Számos tanulmány támasztja alá, hogy a RAAS gátlása lassítja a vesekárosodás progresszióját és az ESRD kialakulását, a monoterápiás hatékonyság igazolása – különösen az MR antagonisták esetében – illetve a vérnyomáscsökkentő hatástól független renoprotekív tulajdonság hátterében álló molekuláris útvonalak, kísérleteink kezdetén még messze nem voltak tisztázottak.

Az MR antagonisták (mint a spironolakton vagy eplerenon) további lehetőséget jelentenek az ARB-k és ACEi-k mellett. Ezzel a gyógyszercsoporttal hatékonyan csökkenthető az aldoszteronescape (aldoszteron –szökés) jelensége, mely a betegek 20-40%-ban jelentkezik [278]. ACEi, vagy ARB adása esetén egyes betegeknél előfordul, hogy az ACE gátlása miatt felhalmozódó ANGI alternatív utakon keresztül megnövekedett aldoszteron temeléshez vezet. Ez tovább fokozza az proteinúriát, növeli a TGF-β indukálta fibrózist és rontja a veseműködést [279].

A spironolakton széleskörű használatát anti-androgén (impotencia, ginekomasztia, menstruációs zavarok) mellékhatásai limitálják [280]. Az eplerenon jóval szelektívebb,

mellékhatásprofilja is kedvezőbb és csökkenti a kardiovaszkuláris mortalitást; ennek ellenére még nincs törzskönyvezve DKD kezelésére [281]. Több vizsgálat már kimutatta a kombinációs terápia előnyeit pl. a proteinúria mérséklésében [282], sőt egy-egy klinikai tanulmány igazolja, hogy monoterápiás használatuk is javítja a DKD progresszióját [283-285], azonban a direkt mechanizmusokról kevés az adat.

Kísérleteinkben a RAASi vérnyomásgátlástól független renoprotektív hatásának vizsgálata volt a célunk, ezért a dózisokat úgy választottuk meg, hogy a vérnyomás változatlan maradjon. Az egyes csoportokban az állatok pulzusa különbözött; a kezeletlen DM állatokban a paraszimpatikus túlsúly bradikardiához vezetett. Ez ellentétes a humán adatokkal: cukorbeteg emberekre inkább nyugalmi tahikardia jellemző a paraszimpatikus beidegzés károsodása következtében [286]. Az MR agonisták a pulzust normalizálták, melyet magyarázhat, hogy ezek a szerek kivédték az aldoszteron fokozott baroreflexet gátló hatását.

A metabolikus paraméterek változása jól jellemezte az STZ indukált T1DM kialakulását: elmaradt a súlynövekedés, nőtt a vércukor és fruktózamin, emelkedtek a lipidszintek. Cukorbetegségben a zsíranyagcsere zavara, fokozza az ateroszklerózis kialakulását és jelentősen növeli a kardiovaszkuláris rizikót. Kísérleteinkben a RAASi csökkentették a lipidszinteket, az MR antagonisták csaknem minden értéket mérsékeltek, az ACEi illetve ARB hatása kevésbé volt kifejezett [287]. Az MR angtagonistákról bizonyították, hogy a hepatociták inzulinrezisztenciájának csökkentésével stabilizálják az adiponektin és a lipoproteinek szintézisét. Gátolják a fehér zsírszövetben a proinflammatorikus citokinek termelődését, így mérséklik a zsírszövet károsodását ezáltal is javítják a zsíranyagcserét [288]. A spironolaktonról ismert, hogy DM-ben mérsélik a lipidszinteket, de eplerenon esetében munkacsoportunk írta le elsőként a készítmény lipidcsökkentő hatását [289]. Bár a cikk megjelenése óta több experimentális adat megerősítette az eredményeket, az első, tavaly lezárult, randomizált, placebo-kontrollált vizsgálat (MIRAD trial) DKD betegekben a jótékony hatást ebben a vonatkozásban egyelőre nem igazolta [290].

A klinikumban is elvárt és tapasztalt renoprotektív hatással összhangban, a RAASi kezelések mérsékelték a vesefunkció beszűkülését, a mikroalbuminúriát, csökkent a vesehipertrófia, javultak a retenciós paraméterek és nőtt a kreatinin-clearence. Bár ez magától értetődőnek tűnhet, fontos ismét kihangsúlyozni, hogy kísérleteinkben elsőként a RAASi szereket a klinikumban alkalmazott dózisoknál alacsonyabb adagban adtuk, kifejezetten azzal a céllal, hogy a vérnyomás változásától független hatékonyságot értékeljük. Lényeges további megfigyelés, hogy a MR antagonisták monoterápiás hatékonysága megegyezett, sőt egyes paraméterek esetében meghaladta a többi RAASi készítményét, melynek hátterében az aldoszteron-escape gátlása is feltételezhető. Első cikkünk

(2012) megjelenését követően klinikai adatok is igazolták, hogy az MR antagonisták monoterápiában a kombinációs adagolással megegyező renoprotektív hatékonysággal bírnak [291].

A funkcionális károsodásokkal párhuzamosan kialakultak a DKD-ban jellemző strukturális elváltozások. A glomeruláris, tubulointerstíciális léziók és endotélsérülés közös eleme az ECM mennyiségének megnövekedése. Ezzel párhuzamosan a citoszkeleton remodelling és a miofibroblaszt differenciáció következtében nagy mennyiségű αSMA keletkezik, a funkcionális szövet helyén fibrotikus hegszövet képződik.

Kísérleteinkben a RAASi csökkentette a mezangiális expanziót, a tubulointerstíciális fibrózist és az αSMA mennyiségét. Eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal, ahol STZindukált DKD-ban 8 hetes ramipril kezelés csökkentette a proteinúriát és a mezangiális mátrix expanziót [292], illetve az αSMA expresszióját [293]. Másik tanulmány T2DM-ben igazolta, hogy enalapril és MRi adásával mérsékelhető a mikroalbuminúria és a glomeruloszklerózis [294], valamint a kollagén IV expresszió [295]. Mindezek az eredmények alátámasztják, hogy a DKD-ben a renális fibrózis csökkentése a RAASi kezelés egyik sarokpontja.

Egyelőre a klinikai gyakorlatban a biopszia az egyetlen lehetőség a renális fibrózis diagnosztizálására, mely invazivitása miatt nagy körültekintéssel és komoly indikációval alkalmazandó. Munkacsoportunk használta először a non-invazív, vizelettel ürülő ECM átalakulásra jellemző új biomarkereket, az ún. Protein FingerprintTM peptideket DKD-ban az antifibrotikus terápia hatékonyságának követésére. Kimutattuk, hogy ezek a jelenleg FDA elfogadás alatt álló biomarkerek jól korrelálnak a hisztológia károsodással és megfelelően jelzik a renális fibrózis jelenlétét. DM-ben mindhárom biomarker szintje megemelkedett, az eplerenon csökkentette a kollagén-II turnover (UC3M) mennyiségét. Az ECM komponensek lebontásának és felépülésének egyensúlyát (turnover) elsősorban az MMP-k mediálják, melyek működését a TIMP-ek szabályozzák. A TIMP1 és kompenzatorikusan az MMP2 mennyiségének növekedését többfajta DM rágcsálómodellben is kimutatták [296, 297] és saját kísérleti eredményeink is ezt támasztják alá. A cukorbeteg állatokban megnövekedett *Mmp2* expressziót a kezelések csökkentették, leghatékonyabban az MR antagonisták, csakúgy mint a *Timp1* mennyiségét.

A profibrotikus faktorok, mint a TGF-β, CTGF/CCN2, és a PDGFB a fibroblasztok proliferációjának, differenciációjának és migrációjának szabályozásán keresztül indukálják az ECM komponensek (kollagén I-III, MMP-k) szintézisét, így vezetnek a fibrózis kialakulásához [298].

A profibrotikus faktorok közül a TGF-β a leginkább tanulmányozott, igazolták a szerepét a fiziológiás szöveti regeneratív folyamatokban, csakúgy, mint a fibrotikus átlalakulásban. A fibroblasztok differenciációjának és a fibrotikus komponensek szintézisének serkentésén keresztül járul hozzá az ECM felszaporodásához [299]. Az irodalmi adatokkal egyezően [300], kísérleteinkben

fokozott *Tgfb1/TGFB1* mRNS expressziót találtunk mind a diabéteszes állatok veséjében, mind a hiperglikémiás proximális tubulus sejtekben. Az emelkedésért a hiperglikémia okozta glükotoxicitás és nem a hiperozmolalitás felelős, mivel az izozmotikus kontroll - mannóz kezelt - csoportban a *TGFB1* expresszió nem emelkedett. A *per os* adott RAASi-k a *Tgfb1* szintet nem csökkentették sem az állatokban, sem a sejteken.

A RAASi és TGF β közötti kapcsolatot csak néhány közlemény tárgyalja. Noha egyesek kimutatták, hogy a RAASi terápia STZ-diabéteszes patkányokban csökkenti a *TGFB1* expressziót, a valsartan [301], illetve az aliskiren [302] adagolása ezekben a vizsgálatokban a DM kezdetétől, szubkután vagy direkt a vesébe történt. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a hatás nagymértékben protokoll-függő és az általunk használt kísérleti rendszerben a RAASi kezelések nem a TGF- β gátlásával fejtik ki antifibrotikus hatásukat.

Más profibrotikus faktorok (PDGFB és a CTGF) aktivációja TGF-β függő és független módon egyarán megvalósulhat. Mindkettő a fibroblasztok citoplazmájában lokalizálódó PDGFR-β-hoz kötődik, ahogy azt renális fibroblasztokban mi is kimutattuk a kísérletek során. A PDGFB homo- és heterodimerekből áll, a károsodott vesében az epitél sejtekben fokozódik a termelése. Hiperglikémiás körülmények között tenyésztett mezangiális sejtekben emelkedett *PDGFB* expressziót írtak le, ami fokozta a fibroblasztok proliferációját, a kollagén és ECM termelést [303]. Ramipril, eplerenon, irbesartan és spironolakton kezelés csökkentette a PDGFB mennyiségét hepatikus [304], miokardiális [305] fibrózisban és ciklosporin nefrotoxicitás experimentális modelljében [306], de DKD-ban munkacsoportunk vizsgálta elsőként a RAASi hatását a PDGFB változásaira.

A CTGF/CCN2 egy celluláris mátrix fehérje, mely az angiogenezisben, gyulladásban, szöveti regenerációban és fibrózisban játszik szerepet [307]. A *CTGF* fokozott termelődése a fibrotikus aktivitás kulcsmarkere. Experimentális DM-ben és humán mintákon egyaránt igazolták, hogy a diabéteszes vesében megnövekedett *CTGF* expressziót [308] a lozartán [309] és a spironolakton csökkenti [310]. Saját rendszerünkben mind a cukorbeteg állatokban, mind a magas glükózon tenyésztett sejtekben megnövekedett a *Pdgfb* és a *Ctgf* expressziója, melyet a RAASi kezelések mérsékeltek. Fontos hangsúlyozni, hogy a kezelések *in vitro* körülmények között is hatékonyak voltak, tehát a RAASi közvetlenül, lokálisan a proximális tubulusokon hatva képes csökkenteni a profibrotikus gének *PDGFB* és *CTGF* (de nem a *TGFB1*) termelődését.

A patkány renális fibroblasztokban profibrotikus PDGFB vagy CTGF/CCN2 indukciót követően az aktin citoszkeleton átrendeződését figyeltük meg. Hasonló jelengséget írtak le humán fibroblaszt [311] és simaizom sejteken [312] PDGFB hatására; illetve podocitákban CTGF/ CCN2 kezelés után [313]. Kimutattuk, hogy a citoszkeletális struktúra megváltozásával párhuzamosan nőtt a fibroblaszt sejtekben a miofibroblaszttá történő átalakulás markereként értelmezhető αSMA

termelése is. Az irodalomban elsőként igazoltuk, hogy a RAASi kezelés közvetlenül csökkenti a fibroblaszt/miofibroblaszt transzformációt, ami felveti, hogy ezek a sejtek a RAASi terápia primer célpontjaként is szolgálhatnak a jövőben.

DM-ben a krónikus hiperglikémia következtében fokozódnak az alternatív anyagcsere utak, így aktiválódik a hexózamin bioszintézis is, melynek során a feleslegben lévő glükóz, különböző metabolitokon keresztül a fehérjék *O*-GlcNAcilációjára használódik fel. Az *O*-GlcNAcilált fehérjék számos jelátviteli útvonal befolyásolásán keresztül (TGF-α és β-1, PAI-1 aktiválás, eNOS és szarkoplazmás retikulum kálcium ATP-áz-SERCA2a gátlás) járulnak hozzá a glükotoxicitáshoz, illetve valószínűsíthetően szerepet játszanak a fibrózis kialakulásában.

Vizsgálataink során STZ-indukált DKD-ben, illetve proximális tubulus sejtekben igazoltuk, hogy a tartós hiperglikémia hatására az *O*-GlcNAcilált fehérjék mennyisége megnő. Bár a folyamat enzimeinek (OGT és OGA) szubcelluláris lokalizációja, szubsztrátspecificitása és funkciója igen különböző, nagyon kevés tanulmányban vizsgálják elkülönítve az egyes izoenzimeket. *In vitro* kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a sejtmagban és a citoplazmában megtalálható ncOGT izoforma szintje hiperglikémia hatására átmenetileg megemelkedik, majd 48 óra elteltével a hatás lecseng. Hasonló dinamikájú csökkenést láttunk a mitokondriumba lokalizálódó mOGT esetében is, mind a tubulusokban, mind a DM vesehomogenizátumban. Adataink arra utalhatnak, hogy krónikusan magas glükózszint mellett átmenetileg fokozódik az *O*-GlcNAc szintézis, azonban hosszabb távon a szintetizáló enzim mennyisége kompenzatórikusan lecsökken a túlzott *O*-GlcNAciláció elkerülése érdekében. Ugyanezt a szabályzási mechanizmust írták le cukorbeteg emberek vörösvérsejtjeiben is [314].

Az OGA kevésbé érzékeny a glükózkoncentráció változásaira, mint az OGT, inkább a celluláris O-GlcNAc szintek szenzoraként értelmezhető. Átmeneti csökkenést követően az OGA-L a proximális tubulusokban nőtt, mintegy válaszreakcióként az *O*-GlcNAciláció fokozódására. Hasonló jelenséget figyeltek meg prediabéteszes betegek vörösvérsejteiben, ahol a magasabb OGA-L szinteket az emelkedett vércukorszintre adott adaptív válaszként magyarázták [314]. Kísérleteinkben ugyanakkor a cukorbeteg állatok veséjében az OGA-L szintje alacsony volt, így felmerül, hogy krónikus hiperglikémia mellett az enzim aktivitás egy idő után eléri a maximumát és nem reagál tovább a megnövekedett *O*-GlcNAc szintekre. Hasonló megfigyeléseket tettek hasnyálmirigy rákban, ahol az enzim csökkenése korrelált az állapot rosszabbodásával [315]. Mindezek alapján az OGA-L nem regulátora, mint inkább a betegség progressziójának *O*-GlcNAc-szinttől független mutatója lehet.

Az OGA-S izoforma az OGA-L-hez képest alacsonyabb aktivitású, ezért kevésbé vesz részt az *O*-GlcNAc csoportok eltávolításában [316]. A proximális tubulus sejtekben az OGA-S mennyisége

szinte detektálhatatlan volt, míg a teljes vese homogenizátumban magas enzimmennyiséget mértünk. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a vesében nem a proximális epitélsejt az OGA-S fő expressziós helye. Irodalmi adatok figyelembevételével, melyekben leírják, hogy a DM-ben megsokszorozódó lipid-depozitumok növelik az OGA-S mennyiségét [317] feltételezzük, hogy kísérleteinkben az izoforma emelkedése a DM-indukált lipidfelhalmozódás következménye is lehet.

Az intrarenális RAAS és az *O*-GlcNAciláció között bidirekcionális a kapcsolat. Az ANGII fokozza a hexózamin bioszintézis kulcsenzimének a GFAT-nak az aktivitását, ezáltal növeli a fehérjék *O*-GlcNAcilációját [318]; illetve fordítva a magasabb *O*-GlcNAciláció serkenti az ANGII expresszióját és a proximális tubulus sejtek hipertrófiájához vezet [319]. Mindezek alapján joggal feltételeztük, hogy a RAAS gátlása mérsékelheti az *O*-GlcNAcilációt és ezáltal protektív a vesekárosodással szemben.

Eredményeink szerint a RAASi kezelés a fehérjék *O*-GlcNAcilációját csökkenti. Kimutattuk, hogy a hatásért nem az OGT szint csökkenése, hanem inkább az oldalláncok eltávolítását végző OGA-L mennyiségének növekedés felelős. A RAASi-k a cukorbeteg állatok veséjében megemelkedett OGA-S szintjét is csökkentették. Mivel az OGA-S expresszió és a lipidszintek között pozitív korreláció van [317], az enzim szintjének csökkenéséhez a RAASi lipidcsökkentő hatása is hozzájárulhat.

Egyre több adat utal arra, hogy a krónikusan emelkedett *O*-GlcNAciláció káros hatásaival szemben, az akut emelkedés serkenti a sejtek túlélési folyamataiban résztvevő (prosurvival) jelátviteli utakat [320]. A hiperglikémiát a tubulus sejtekben hipoxia, celluláris endoplazmatikus és oxidatív stressz kíséri. Ismert, hogy az *O*-GlcNAciláció protektív a hipoxiával szemben [321], továbbá a magas *O*-GlcNAc szint fokozza a hősokk-választ (a HSF-1 transzlokációját és a HSP72 expresszióját) a proximális tubulus sejtekben [322]. Mindezek alapján feltételeztük, hogy az *O*-GlcNAciláció akut emelkedése a magas glükóz szint által indukált celluláris stresszválaszt is befolyásolja.

Kísérleteinkben, hiperglikémia hatására a HSP72 fehérjeszint átmeneti gyors emelkedést követően 48 óra után lecsökkent. Ezzel párhuzamosan változott a NKA fehérje mennyisége is. A diabéteszes vesékben - összhangban az irodalmi adatokkal - a HSP72 termelődése csökkent [323]. A NKA szintje pedig bár megemelkedett, az enzim a bazálmembránból az apikális membránra transzlokálódott, így összességében az enzimműködés károsodott. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy krónikus hiperglikémiában károsodik a stresszválasz, csökken a HSP72 szintézise, kevésbé érvényesül, a chaperon-funkció. A citoszkeletális és membránstruktúrák sérülése, illetve a fokozódó hipoxia miatt a NKA működése zavart szenved és tovább romlik a vesefunkció [324, 325].

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. Ezzel párhuzamosan *in vitro* is kimutattuk, hogy a hiperglikémia önmagában, ozmoláris hatásától függetlenül fokozza a NKA expresszióját, amit az egyes RAASi kezelések kivédenek. Korábban leírták, hogy az ANGII gátolja az Akt-eNOS mediált NKA bazolaterális lokalizációt [326], így az is elképzelhető, hogy a RAASi terápia ezen az útvonalon keresztül segíti a nátrium pumpa fiziológiás lokalizációjának fenntartását.

Az elmúlt évtizedek kutatásai alapján napjainkra már egyértelmű, hogy a NOS rendszer, elsősorban az eNOS károsodása és az NO hiány a DKD kialakulásának patognomikus faktora. Az NO jelentőségét még mindig elsősorban a vese vaszkuláris endothéliumában hangsúlyozzák, az elmúlt pár évben vetődött fel a szerepe a tubuláris károsodás folyamatában. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a hiperglikémia gátolja az eNOS foszforilációt, mind a proximális tubulus sejtekben mind a cukorbeteg állatok veséjében. Hasonló eredményre jutottak endotél sejtekben is, ahol a hiperglikémia növelte az eNOS *O*-GlcNAcilációt, míg az eNOS foszforiláció csökkent [327]. Diabéteszes állatok aortájában pedig az *O*-GlcNAciláció emelkedésével párhuzamosan az eNOS foszforilációja alacsonyabb volt [328, 329]. Tekintettel arra, hogy a foszoriláció az *O*-GlcNAciláció kompetitív folyamat, feltételezzük, hogy DM-ben a fokozott *O*-GlcNAciláció felelős az eNOS csökkent Ser-1177 foszforilációjáért (A folyamat bizonyítására vesében többször tettünk immunprecipitációval kísérletet, technikai okokból sajnos nem sikerült a hipotézist kísérleti adatokkal egyértelműen alátámasztanunk).

Az eNOS Ser-1177 oldalláncon történő foszforilásában a pAkt, mely önmaga is *O*-GlcNAcilálódhat kulcsfontosságú [234]. Eredményeink azt mutatják, hogy hiperglikémiában az Akt foszforilációja is zavart szenvedett, hiszen a magasabb Akt szintek ellenére a pAkt mennyisége nem változott a cukorbeteg állatok veséjében. Mindezek alapján az is felmerül, hogy nem csak a peNOS direkt *O*-GlcNAcilációja, hanem az Akt *O*-GlcNAcilálódása is gátolja az eNOS foszforilációját és aktivációját. Adataink megmagyarázhatnak számos korábbi kutatási eredményt, melyben az Akt/eNOS foszforiláció csökkenését találták diabéteszes vesében [330, 331].

Összegezve kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a monoterápiában alkalmazott RAASi terápia hatékony a DKD által kiváltott vesekárosodás csökkentésében és a fibrotikus folyamatok mérséklésében. Eredményeink alapján az MR antagonisták legalább olyan effektívek a DKD progressziójának lassításában, mint a rutinszerűen használt ACEi-k vagy ARB-k. Adataink új molekuláris mechanizmusok, a PDGFB/CTGG-mediált RAAS gátlás, illetve az *O*-GlcNAciláció jelentőségét támasztják alá a hiperglikémia indukálta renális fibrózis kórfolyamatában.

Mindezen ígéretes adatok ellenére a klinikai tapasztalatok és a nagyszámű kohorszon végzett multicentrikus vizsgálat alapján egyértelmű, hogy a RAASi-k önmagukban nem jelentenek megoldást a DKD kezelésére, ezért folyamatosan zajlik a kutatás új terápiás lehetőségek feltérképezésére.

Az SGLT2i a legújabb típusú antidiabetikumok, melyek áttörést hoztak nemcsak a szénhidrátanyagcsere mérséklésében, de a szövődmények kezelésében is. A már lezárt klinikai tanulmányok (EMPA-REG OUTCOME trial [332], CANVAS Program [333] és legutóbb a DECLARE-TIMI58 [334] egyértelműen bizonyították, hogy az SGLT2i-k mérséklik a GFR beszűkülését és csökkentik az ESRD kialakulásának rizikóját. Az eredményeket már több célzottan a veseszövődményekre irányuló vizsgálat a CREDENCE [174] és a legújabb CVD-REAL 3 [335] is megerősítette. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy nem specifiusan egy készítményről, hanem a gliflozinok csoporthatásáról van szó.

Az eddigi klinikai tanulmányok T2DM betegeken készültek, T1DM-ben nincs még adat a DAPA-val, és számos ponton feltáratlan a hatásmechanizmus is. Ezeknek a nyitott kérdéseknek a megválaszolása volt az elsődleges célunk STZ-indukált DM-ben végzett kísérleteink során, illetve kíváncsiak voltunk arra, hogy a lozartánnal történő kombinációs kezelés jelent-e további előnyt a renoprotekció szempontjából.

Kimutattuk, hogy a DAPA kezelés hatékonyan és biztonságosan (súlyos hipo, ill. hiperglikémiás epizódok nélkül) csökkenti a vesefunkció romlását és a vese struktúrális károsodását. A klasszikus retenciós paraméterek mellett, a vizelettel ürülő KIM-1 és NGAL szintek is közel felére csökkentek és korreláltak a vesefunkció javulásával. Egy közelmúltban megjelent tanulmányban hasonló változást mértek DAPA-val kezelt T2DM patkányokban is [336].

Az SGLT2i antifibrotikus vesevédő hatása az elmúlt egy-két évben a figyelem középpontjába került. Tavaly megjelent közleményükben T2D-ben szenvedő betegekben Heerspink és mtsai hálózatelemzési módszerek adatait korreláltatva vesefunkciós paraméterekkel és biopsziás eredményekkel kimutatták, hogy a canagliflozin megállítja a DM-indukált ECM átalakulást és lassítja a fibrózis kialakulását [337].

Vizsgálatainkban igazoltuk, 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 fibronektin) termelődését. Közleményünk megjelenése óta hasonló eredményekről számoltak be DAPA kezelt T1DM egerekben is [338]. A DAPA antifibrotikus hatása tükröződött a vizeletben detektálható Protein FingerprintTM fehérjék mennyiségében: csökkent a rPRO-C3 és a TUM szintje, a javulás korrelált a szövettani mintákon észlelt eltérésekkel. Adataink tovább validálják és referenciaként szolgálnak a Protein FingerprintTM

fehérjék alkalmazhatóságát illetően és reméljük, hogy segítik a módszer mielőbbi bevezetését a klinikai diagnosztikai gyakorlatba.

Mivel a RAASi és az SGLTi hatásmechanizmusa eltér, logikusan vetődik fel az igény a kombinációs terápia alkalmazására a várható szinergista hatás elérésre érdekében. Ennek ellenére tudomásunk szerint T1DM-ben nem történt ilyen jellegű vizsgálat. Meglepetésünkre kísérleteinkben sem a cukorbeteg állatokban, sem az *in vitro* modellben nem észleltük a kombinációs terápiában adott lozartán szinergista hatását.

A kombinációs kezelés előnyeiről T2DM-ben sincsen túl sok adat, egy-két vizsgálat elérhető csak, de ezek mindegyikében már hipertóniás betegek kaptak RAASi kezelést, így az eredmények összehasonlíthatósága igen korlátozott. DAPA+RAASi kezelt T2DM betegekben csökkent az albuminúria, de nem vizsgálták, hogy a hatás független-e a vércukor vagy a vérnyomás csökkenésétől, illetve nem tanulmányozták a kombináció hatását más kezelésekkel összehasonlítva [339]. Egy másik tanulmány arról számol be, hogy RAASi kezelt hipertóniás betegekben a DAPA adása ugyan csökkentette a testsúlyt és a vérnyomást, de az albuminúriát nem mérésékelte [340].

A preklinikai eredmények sem egyértelműek. T2DM modellben kimutatták, hogy DAPA + irbesartan kezelés hatékonyabb a retenciós paraméterek és a hisztológiai károsodás csökkentésében, mint bármelyik szer monoterápiában. Ugyanakkor kiemelendő, hogy a vizsgálat célja nem a már kialakult károsodás progressziójának lassítása volt, hanem a prevenció, ezért a terápiát már a DM indukciójától kezdve, 12 héten át adták. Ez a protokoll a klinikai használatra vonatkozóan nehezen adaptálható, hiszen T2DM-ben a betegség akár egy évtizedig is tünetmentes lehet [341]. Egy másik tanulmányban Dahl-sensitive hipertóniás STZ patkányokban luseogliflozin és ACEi kombinált gátlásról igazolták, hogy a vérnyomáscsökkentő és hiperfiltrációt gátló hatása kedvezőbb, mint a monoterápiának. A proteinúriában, illetve a szövettani károsodásban nem volt különbség, ez arra utal, hogy renoprotekció tekintetében nem egyértelmű a kombinációs terápia szuperior hatása [342]. Összességében megállapítható, hogy egyelőre nagyon különböző és kevés kísérleti eredmény áll rendelkezésre, további vizsgálatok szükségesek a kombinációs terápia létjogosultságának értékeléséhez.

Az SGLT2i renoprotektív hatásának hátterében számos komplext mechanizmust feltételeznek. A legkézenfekvőbb, hogy a vércukorszint csökkentése mérsékli a hiperglikémia indukálta alternatív anyagcsere utak aktiválódását, a gyulladást és oxidatív stresszt, de az elmúlt években a proximális tubulusok hipoxiája is újra a kutatások, így saját vizsgálataink érdeklődésének is középpontjába került.

RAASi-val végzett kísérleteink során már kimutattuk, hogy a proximális tubulusokban ill a diabéteszes vesében megnövekedettt *O*-GlcNAciláció hozzájárul a vese károsodásához és a fibrózis

kialakulásához. Tekintettel arra, hogy a DAPA közvetlenül a proximális tubulusok glükózfelvételét gátolja feltételeztük, hogy a DAPA kezelés befolyásolja a fehérjék *O*-GlcNAcilációját és a profibrotikus faktorok termelődését. HK-2 sejteken és a teljes vesében egyarán kimutattuk, hogy a DAPA kezelés csökkenti a hiperglikémia indukált *O*-GlcNAcilációt, elsősorban az OGT – vagyis a szintézisért felelős enzim gátlásán keresztül. Ezzel párhuzamosan DAPA hatására a vesében csökkent a *Ctgf és Pdgfb* mRNS expresszió, a HK-2 sejtekben csak a *CTGF*, míg a *TGFB* mennyisége DAPA kezelés hatására nem változott. Ez összhangban van korábbi RAASi eredményeinkkel, ahol a kezelés szintén nem befolyásolta a *TGFB* expreszióját.

A klinikai adatok arra utalnak, hogy az SGLT2i renoprotektív hatása meghaladja a vércukor csökkentése alapján várhatót, azonban a különböző mechanizmusokat komplex *in vivo* rendszerekben nehéz elkülönítve vizsgálni. Kísérleteinket ezért elvégeztük hipoxiás sejtes modellben is, a tubuláris hipoxia szerepének tanulmányozására.

A tubuláris hipoxia a DKD progressziójának meghatározó tényezője [343]. A megnövekedett oxigén felhasználást DKD-ban a glomeruláris hiperfiltráció, illetve a fokozott, SGLT2 mediált glükóz reabszorpció magyarázza [344]. Körner és mtsai már 1994-ben leírták, hogy az STZ-állatokból izolált proximális tubuláris sejtek oxigén felhasználása jóval meghaladja a kontrollokét [150]. Bár ez a felismerés majd két évtizedig érdemtelenül háttérbe szorult, az utóbbi pár évben megerősítették a kezdeti eredményeket. Palm és mtsa. Clark-típusú mikroelektródák segítségével kimutatta, hogy cukorbeteg patkányok veséjében alacsonyabb az oxigén-nyomás [151]. Ajelenséget mások fMRI képalkotással is alátámasztották [345].

A hipoxiához történő adaptációban a HIF-1 α aktivációja elengedhetetlen. Hipoxiát követően a HIF-1 α a sejtmagba transzlokálódik, ahol a HIF-1 β -val dimerizálódva számos – a celluláris oxigén homeosztázisban szerepet játszó - gén promoteréhez köt és jelátviteli folyamatokat indukál [346]. Saját kísérletünkhöz hasonló beállítások (1% O2, 5% CO2 and 94% N2) mellett proximális tubulus sejtekben és más sejttípusban is leírták a HIF-1 α aktivációját [347-349]. Vizsgálatainkban több módszerrel (qRT-PCR, Western blot, immunocitokémia) visszaigazoltuk, hogy a hipoxiát követően a HIF-1 α szintje jelentősen megemelkedik és a fehérje a proximális tubulusok sejtmagjába helyeződik át. A nukleáris transzlokalizáció aktiválja az EPO termelést és a VEGF - mediált angiogenetikus útvonalat.

Ismert, hogy a krónikus hipoxia a HIF-1 α mediált ECM termelés szabályozásán keresztül fokozza a tubulointertíciális fibrózis kialakulását is [350, 351]. A hipoxia önmagában serkenti a proximális tubulus sejtek miofibroblassztá történő transzformációját [352], illetve növeli a TGF- β [353, 354], CTGF [355] és PDGFB termelését [356]. *In vitro* kísérleteinkben igazoltuk, hogy a DAPA csökkenti a hipoxia-indukált *CTGF* és *PDGF* termelést, ami arra utal, hogy a DAPA antifibrotikus
hatása direkt kapcsolatban lehet a hipoxiás károsodással. Bár az SGLT2i hipoxiás károsodást befolyásoló hatása komplex folyamat, és további vizsgálatokat igényel, eredményeink felvetik ennek a gyógyszercsoportnak az alkalmazási lehetőségét más, hipoxiával összefüggő vesekárosodás terápiájában.

Kísérleteink alátámasztják, hogy a DAPA biztonsággal alkalmazható T1DM-ben a DKD funkcionális és szöveti károsodásának megelőzésére. A renoprotektív hatás hátterében az *O*-GlcNAciláció gátlása az egyik feltételezett mechanizmus. A hiperglikémiával párhuzamosan jelenlévő hipoxia miatt kialakuló profibrotikus faktorokat a DAPA kezelés csökkenti, így másik útvonalon, az oxigénhiány okozta károsodás mérséklésével is hozzájárul a fibrózis megelőzéséhez és a vesefunkció javításához.

A DKD mérséklésre a renális fibrózis kezelésére irányuló kísérleteink harmadik részében S1R agonistákat alkalmaztunk a károsodás csökkentésére. A S1R agonisták központi idegrendszeren kívüli hatásairól, lokalizációjáról, vizsgálataink megkezdésekor szinte nem állt rendelkezésre irodalmi adat. A receptor szerepét kizárólag az agyban vizsgálták kognitív folyamatokban, sztrókban, Alzheimer és Parkinson kórban. Bár ezek a közlemények leírták, hogy a S1R aktivációja neuroprotektív hatású, egyrészt a gyulladás mérséklése, másrészt az eNOS - nNOS mediált perfúzió javítása által, senkiben nem vetődött fel, hogy jelen van-e, szerepet játszik-e ez a receptor a perifériás szervekben.

Kísérleteink során elsőként vizsgáltuk a S1R jelenlétét az egyes nefronszegmensekben. Igazoltuk, hogy a S1R expresszálódik a vesében, legnagyobb mennyiségben a kortexben, de jelen van a medullában és a papillában is. Immunohisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy leginkább a proximális tubulusokba lokalizálódik. Tekintettel arra, hogy a renális fibrózis folyamatában a gyulladás, a hipoxia kulcsfontosságú, és a S1R agonista kezelés ezeket a kórfolyamatokat gátolja az agyban feltételeztük, hogy hasonló protektív hatásokat észlelünk a vesében is.

Három protokollt hajtottunk végre. Egyrészt az SSRI-ként alkalmazott szokásos *per os* 20 mg/tskg dózist adtuk rögtön a cukorbetegség kezdetétől 7 héten át (itt a prevenciós hatást vizsgáltuk), illetve 2 hétig, ahol azt tanulmányoztuk, hogy mennyiben lassítja a már kialakult károsodást a FLU kezelés. A kéthetes protokollt megismételtük a szokásos dózis tizedével (2 mg/tskg), illetve NE100-zal történő kombinációban, a S1R mediált hatás bizonyítására.

Az alacsonyabb dózis kipróbálását több érv támasztotta alá. A FLU SSRI készítmény, a véragy gáton keresztül bejut az agyba, ezért a minimálisan hatékony dózis meghatározása különösen fontos az esetlegesen jelentkező központi idegrendszeri hatások minimalizálására. Noha a gyógyszer

több évtizede piacon van, és egészséges emberekben nem írtak le komoly mellékhatásokat, különös körültekintéssel akartunk eljárni. Szabadalmaztatási szempontból is fontos egy új dózis alkalmazása: amennyiben generikumként a piacon lévő szerről sikerül igazolni, hogy a szokásos adagolástól eltérő dózisban, más formulációban is hatásos, az indikációbővítésnek minősül. Ez esetben a szabadalmaztatás - engedélyeztetés folyamata jóval egyszerűbb.

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a S1R agonista FLU hatékony a DKD-ban jelentkező vesefunkció beszűkülés lassítására, javítja a retenciós paramétereket, mérsékeli a mikroalbuminúriát. A funkcionális károsodás mellett a kezelés csökkentette a mezangiális mátrix proliferációt és a renális fibrózist, az NE100 a javulást felfüggesztette. A renoprotektív hatás dózisfüggő módon érvényesült: a szokásos SSRI-ként használt dózisban (20 mg/ttskg) a kezelés minden paramétert javított, míg a kisebb 2 mg/tskg adag a szövettani károsodás megelőzésében nem volt hatékony. A preventív céllal adott hosszútávú kezelés kedvezőbb, szinte minden paraméter tekintetében kétszer olyan hatékony volt, mint a kéthetes kezelés.

Néhány pilot vizsgálatban TGF-β, illetve PDGFB indukált fibroblasztokon igazoltuk, hogy a S1R agonizmusa direkten gátoja a fibroblasztok proliferációját, illetve az ECM komponensek termelését. Kimutattuk, hogy nem csak FLU, de más, specifikusabb S1R agonista (SA4503, PRE-084) adását követően is csökken a fibroblasztok proliferációja és kollagén termelődése. További állatkísérleteket is végeztünk bleomicin-indukált tüdőfibrózis modelljében, ahol a S1R agonista kezelés mérsékelte a gyulladást és csökkentette a fibrotikus szövet felszaporodását a tüdőben (az adatok bemutatása meghaladja a dolgozat kereteit).

Kísérleteink jelenleg is zajlanak a molekuláris mechanizmus további tisztázására. Az itt bemutatott, a S1R agonisták antifibrotikus hatását leíró eredményeinkből nemzetközi szabadalom született, melyet mostanra az USA-ban (US10,124,006,B2), Kínában (162686/CN-DAN-1), Izraelben (247143), Japánban már bejegyeztek, Európában már elfogadtak és bejegyzés alatt áll.

A tüdőben kimutatott hatás alapján, a dolgozat beadásával egyidőben az OGYÉI engedélyezte egy fázis IIb klinikai vizsgálat elindítását, mellyel Sars-CoV 19 betegekben vizsgálhatjuk a FLU kezelés hatékonyságát és biztonságosságát a tüdőgyulladással összefüggő akut tünetek mérséklésében, illetve a hosszútávú szövődmények, elsősorban a tüdőfibrózis megelőzésében.

ÚJ STRATÉGIÁK A VESETRANSZPLANTÁCIÓ KIMENETELÉNEK JAVÍTÁSÁRA

A nemi különbségek szerepe a vesebetegségek patomechanizmusában, az AKI-val szembeni érzékenységben, a veseátültetést követő rövid- és hosszútávú graft-funkcióban régóta tanulmányozott és vitás kérdés. Kimutatták, hogy 45 évnél idősebb nőkben rosszabb a hosszútávú graftműködés mint férfiakban [357]. Más adatok szerint a női nem (akár a donor, akár a recipiens oldaláról) csökkenti az az akut rejekciót, vagy a DFG-t, bár a nemi különbség 65 év felett eltűnik [358]. Hasonló következtetéseket vontak le egy másik vizsgálatban, ahol a férfi nemet a IRI károsodás okozta AKI gyakoriságának és mortalitásának független prediktoraként azonosították [359].

Munkacsoportunk számos közleményben tárgyalta a nemi különbségek jelentőségét az AKI patomechanizmusában és kimenetelében. Másokkal összhangban megállapítottuk, hogy a nőstények posztiszkémiás túlélése és vesefunkciója jobb, mint a hímeké [207, 360-362], a jelenség magyarázataként számos molekuláris tényezőt azonosítottunk. Úgy gondoljuk, hogy az ösztrogén szerepe kulcsfontosságú, a hím állatok ösztrogén kezelése javítja a túlélést és csökkenti a vesekárosodást, míg a kasztráció hasonló hatással nem jár [207]. Más vizsgálatok ugyanakkor a különbség hátterében inkább a tesztoszteron jelenlétét, mint az ösztrogén hiányát feltételezik [363]. Olyan adatok is vannak, ahol ösztrogén receptor knock-out nőstényekben kardiális iszkémiát követően enyhébb károsodást írtak le, ami felveti az ösztrogének, ösztrogén receptortól független, más mechanizmussal kifejtett védő hatását [364]. Mindezek alapján egyértelmű a nemi hormonok jelentősége az IRI-vel szembeni érzékenységben, de az ösztrogén szerepe, esetleg egyéb faktor jelentősége részleteiben nem tisztázott [365].

Korábbi, nemi különbséget vizsgáló kísérleteink során kimutattuk, hogy a DHEA előkezelés csökkenti egyes proinflammatorikus citokinek és a VEGF expresszióját [239]. Feltételeztük, hogy a jelenség a DHEA ösztrogénszerű hatásával magyarázható, azonban a kezelési csoportokban mért hormonszintek nem támasztották alá a hipotézisünket: a DHEA kezelt csoport ösztrogénszintje azonos volt a hímekével. Kísérleteinket kevéssel megelőzően jelentek meg azok a közlemények, melyek felvetették, hogy a DHEA neuroszteroid hatásának közvetítésében a S1R fontos lehet [366, 367], így ebben az irányban indultunk tovább.

A S1R szerepét iszkémiás károsodás kapcsán több tanulmány igazolta. Elsősorban az agyban írták le, hogy a receptor serkentése mérsékli a posztiszkémiás lézió nagyságát és a neurológiai deficitet, javítja a tanulást és a memóriát [368, 369]. *In vitro* endotélsejtkultúrában kimutatták, hogy az ösztrogén - saját receptorától függetlenül - a S1R-on keresztül csökkenti az endotélsejtek endotelin-1 termelését, ami felveti a S1R a szerepét a nemi hormonok hatásának közvetítésében [370].

Korábbiakban leírtuk, hogy a S1R a vesében jelen van, a proximális tubulus sejtekben expresszálódik. Ismert, hogy fiziológiás körülmények között a receptor az ER-on lokalizálódik,

ligand-stimulációt követően a citoplazmába és a magba transzlokálódva chaperonfunkciót lát el és számos szignáltranszdukciós útvonalat aktivál [371]. Jelen vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy az ösztrogén, mint a S1R endogén ligandja proximális tubulus sejtekben a receptor perinukleáris régióból citoplazmába történő áthelyeződését indukálja. Ezzel párhuzamosan a HSF-1 intracelluláris lokalizációja is megváltozott az ösztrogén kezelés hatására, a citoszólból a sejtmagba helyeződött át, ahol fokozta a hősokk válaszban résztvevő fehérjék (HSP72 és kisebb mértékben a HSP27) termelődését. A fehérjék emelkedését *in vitro* az NE100 kezelés felfüggesztette, ami a S1R mediált hatást támasztja alá.

In vivo a nőstényekben magasabb HSF-1 és HSP szinteket mértünk, mint hímekben, illetve az ovariektomizált csoportban, már a kontrollokban, illetve a posztiszkémiás periódusban is. Hasonló jelenséget detektáltak szívizomsejtekben, ahol az ösztrogén kezelés növelte az HSF-1 expresszióját és aktiválta a többi hősokk fehérje termelését, míg a hatás tesztoszteron kezelést követően elmaradt [372]. Voss és mtsai arról számoltak be, hogy ovariektomiát követően nőstény állatok szívében a hímekéhez hasonlóan alacsony szintre csökkent a HSP72 mennyisége, ami ösztrogénpótással helyreállítható volt [373].

A HSP72 és a HSP27 komoly szerepet tölt be a citoszkeleton struktújának fenntartásában, inzultust követően a membránfehérjék szerkezetének helyreállításában, a károsodott proteinek gyors eliminációjában. A HSPk a membránstruktúra helyreállításával fontosak a NKA működésének megőrzésében is. A NKA a szervezet ion-, és víz homeosztázisának kulcsenzime, működése nagymértékben ATP igényes, ezért az enzimfunkció különösen érzékeny a hipoxiás inzultusra. IRI-t követően az enzim a bazolaterális membránról transzlokálódik, a pumpafunkció zavart szenved, részben ez okozza a nátrium retenciót és a szöveti ödémát. Kísérleteink során mind az ösztrogén kezelt sejtekben, mind a nőstény állatokban a NKA lokalizációja megtartottabb maradt. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy az ösztrogén jelenléte – részben a S1R-on keresztül – aktívabb hősokk választ, ezáltal kedvezőbb chaperonfunkciót eredményez fiziológiás és patofiziológiás körülmények között egyaránt.

Következő célunk az volt, hogy S1R agonista kezeléssel a hímek posztiszkémiás túlélését javítsuk és a renális károsodást mérsékeljük, ehhez endogén ligandként DHEA-t, illetve második lépcsőben nagyobb affinitású FLU-t használtunk.

A DHEA az elmúlt évtizedben, mint az új "anti-aging hormon" a figyelem középpontjába került. Anti-inflammatorikus, anti-apoptotikus tulajdonságait számos közleményben tárgyalták. Felvetődött a jótékony hatás obezitásban, DM-ben, a kardiovaszkuláris mortalitás csökkentésében és depresszióban [367, 374-376] is. A nőkben a menopauza idején, az ösztrogénnel együtt a DHEA szintje is jelentősen csökken, amit összefüggésbe hoztak a sztrók növekedésével [377]. IRI –vel

szemben kifejtett védő hatását több szervben is leírták, így az izomban [378], bélben [379], szívben [380].

Az irodalmi adatokkal összhangban [239, 381] első kísérletsorozatunkban igazoltuk, hogy DHEA előkezelés hatására az IRI-t követő posztiszkémiás túlélés javult, a retenciós paraméterek mérséklődtek, a hisztológiai károsodás enyhébb volt. Két-foton mikroszkópos mérésekkel DHEA hatására a peritubuláris kapillárisok érátmérőjének növekedését detektáltunk. Korábbi szívben [382], illetve endotélsejtekben [383] végzett vizsgálatok egyértelműen beszámolnak a DHEA – ösztrogénreceptoroktól függetlenül megvalósuló – eNOS aktivációt kiváltó hatásáról. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a peritubuláris kapillárisok dilatációja és a kedvezőbb renális perfúzió a DHEA kezelés S1R-NO jelátviteli úton keresztül megvalósuló következménye. Második kísérletsorozatunkban ezt kívántuk részletesen bizonyítani.

A FLU előkezelés legfontosabb kemény végpontjaként a posztiszkémiás túlélés jelentős javulását észleltük, az állatok egyharmada túlélte a beavatkozást követő első hetet és teljesen felépült az iszkémiás károsodásból. A retenciós paraméterek (kreatinin és BUN) csökkenése 24 órával az inzultust követően bár szignifikáns volt, de messze nem olyan meggyőző, mint a túlélésben látott különbség. Fontos kihangsúlyozni, hogy a posztiszkémiás károsodás az inzultust követő 24-48 órában a legkifejezettebb, így kisebb, vagy mérsékelt eltérések esetenként nem tükröződnek látványos statisztikai eredményben. Ugyanakkor egyre több klinikai tanulmány hívja fel a figyelmet arra, hogy AKI során, vagy a korai posztiszkémiás szakaszban a kreatinin minimális (akár szubklinikai) emelkedése is erős korrelációt mutat a fokozott mortalitással [384, 385], komolyan kell venni.

Mindez inkább arra utal, hogy a jelenleg használt hagyományos paraméterek nem kellően szenzitív jelzői a vesekárosodásnak, ezért mértük a tubulusok sérülését jóval specifikusabban jelző KIM-1, NGAL és izolált AST változásokat is. Az NGAL, mely elsősorban a disztális tubulusok specifikus markere, anti-apoptotikus tulajdonságokkal is bír [386]. A KIM-1 egészséges vesében szinte nem expresszálódik, de hipoxia vagy iszkémia hatására fokozódik a termelése, a proximális tubulus oxigénhiányra legérzékenyebb S3 szegmentjében. A KIM-1 fontos szerepet tölt be a regeneratív folyamatokban is, részt vesz az elhalt nekrotikus sejttörmelék eltávolításában [387]. Mindegyik paraméter megemelkedett IRI-t követően és alacsonyabb volt a FLU kezelt csoportban [388, 389]. A HIF-1α nem csupán a hipoxiás károsodás markere, de, ahogy a korábbiakban már ismertettem, számos, a tubulus sejtek regenerációjában szerepet játszó gén aktivációját szabályozza, Elképzelhető, hogy a FLU kezelést követően detektált emelkedett HIF-1α hozzájárul a tubulusok túléléséhez.

Mind a hagyományos hisztológiai vizsgálat, mind az *in vivo* két-foton mikroszkópos képek alapján látszik, hogy a FLU kezelés jelentősen mérsékelte a tubuláris károsodást. Egy héttel az IRI

inzultus után a vese struktúrája csaknem a kontrollokra jellemző, intakt képet mutatta, enyhe leukocita infiltráció utalt csak a lezajlott gyulladásra.

Bár patkányokban bizonyos modellekben gyengébb szisztémás gyulladásos válasz indukálódik, mint egerekben, kísérleteinkben IRI-t követően egyes proinflammatorikus citokinek mennyisége számottevően emelkedett a vesében. Az IL-1α –ról az agyban a közelmúltban írták le, hogy az egyik legkorábban aktiválódó proinlfammatorikus citokin és kulcsfontosságú a cerebrovaszkuláris gyulladás beindításában/szabályozásában [390, 391]. Munkacsoportunk vizsgálta elsőként a szerepét a vesében. Kimutattuk, hogy IRI-t követően FLU hatására az IL-1α szintje kevésbé emelkedett, mint a kezeletlen állatokban, míg a másik fontos szabályozó citokin az IL-10 szintje nőtt. Az IL-10 gátolja egyes proinflammatorikus citokinek szintézisét és a leukociták aktivációját, egyes vesekárosodás modellekben már igazolták az IL-10 kezelés protektív hatását [392, 393]. A szisztémás gyulladás következtében kialakuló, az AKI-t kísérő többszervi károsodás (multiorgan failure) mind a klinikai gyakorlatban, mind experimentális modellekben jól ismert jelenség, mely jelentősen fokozza a mortalitást [394]. Adataink alapján, illetve a korábbi agyi, illetve kardiális iszkémiában végzett vizsgálatok eredményeiből kiindulva [195, 395] feltételezzük, hogy a FLU kezelt állatok jobb túlélésében a renoprotekció mellett fontos szerepe van a S1R agonisták szisztémás anti-inflammatorikus hatásának.

Ösztrogénnel végzett kísérleteinkhez hasonlóan FLU kezelést követően is a S1R áthelyeződését figyeltük meg a perinukleáris régióból a citoszólba és a sejtmagba fiziológiás állapotban és H₂O₂ indukálta oxidatív stressz kapcsán egyaránt. A transzlokáció pontos mechanizmusa nem ismert, elképzelhető, hogy az áthelyeződés során az inositol requiring enzyme – 1(IRE1) protein kináz indukálódik, ami aktiválja a PI3K/Akt foszforilációs útvonalat.

Az Akt-NO jelátviteli út az IRI károsodásban és a vazoregulációban szerepet játszó egyik legösszetettebb szignáltranszdukciós mechanizmus. Néhány eleme, pl. az Akt-eNOS aktiváció már részleteiben is feltárt, míg számos komponens továbbra is ismeretlen. Az NO renális termelődésért legnagyobb részben az eNOS, kisebb mértékben és elsősorban patológiás körülmények között, az nNOS a felelős. Feltételezzük, hogy kísérleteinkben a FLU kezelt csoportban észlelt kedvezőbb renális perfúzió a S1R-Akt-NO mediált vazodilatáció következménye. Hipotézisünket alátámasztotta, hogy peNOS szintje mind a S1R géncsendesített sejtekben, mind az Akt inhibitor kezelések hatására lecsökkent a proximális tubulus sejtekben.

Eredményeinket irodalmi adatok is megerősítik. Fukunaga és mtsai. több publikációban is beszámolnak a szívben a S1R aktiváció szerepéről az eNOS termelődésében és az iszkémiás károsodás csökkentésében [194, 195, 396-398]. Más vizsgálatok neuropátiás fájdalom esetén igazolták a S1R mediált NO termelődés szerepét. Hippokampális neuronokban a DHEA növelte az

nNOS mediált NO termelődését spinális neuronális hiperszenzitivitásban [399]. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy releváns jelátviteli útvonalról van szó, de további kísérletek szükségesek, különösen a periférián a molekuláris mechanizmusok tisztázására.

A FLU által kiváltott NOS termelődés renális perfúzióra kifejtett hatásának vizsgálatára *in vivo* mértük a peritubuláris kapillárisok átmérőjének változását. A periciták révén, melyek minden kapilláris, illetve a kis arteriolák és venulák falában megtalálhatók, a peritubuláris kapillárisok vazoaktív mediátorok (pl. NO) hatására aktív kontrakcióra képesek [400, 401]. Kísérleteinkben az NO termelődéssel párhuzamosan a peritubuláris kapillárisok dilatációja a FLU kezeléssel szinte azonos időben, rögtön jelentkezett. Hasonlóképpen gyorsan reagáltak a kiserek az IRI okozta vazokonstrikcióra, amit a FLU kezelés megakadályozott.

Ismert, hogy a vesében az nNOS termelés fő helye a macula densa, de az enzim kisebb mennyiségben a proximális és disztális tubulusokban is megtalálható, szerepe kevéssé tisztázott [402]. Míg FLU kezelésre azonnali gyors eNOS termelést detektáltunk, az nNOS szint csak a reperfúzió későbbi szakaszában emelkedett. Ezek az adatok összhangban vannak korábbi, más vesekárosodás modellekben talált eredményeinkkel, melyek szintén az eNOS és nNOs különböző expressziós profilját és aktiválódási dinamikáját vizsgálták [403]. A vazodilatáció nem következett be, ha a FLU kezelést S1R agonista, vagy NOS gátló adásával egészítettük ki. Mindez alátámasztja, hogy a kedvezőbb renális vérellátás és enyhébb posztiszkémiás károsodás hátterében a S1R mediált fokozott NO termelés szerepe igazolható.

Eredményeink értékelésekor fontos figyelembe venni, hogy a FLU elsődlegesen a depresszió kezelésére használt SSRI, mely befolyásolja az agyi szerotonerg és noradrenerg rendszereket is. A S1R-tól független, ezen rendszereken megvalósuló hatás még az NE100 adagolásával sem zárható teljesen ki. Ugyanakkor ismert, szívben és az agyban már bizonyított, hogy a szintén SSRI csoportban tartozó, de nagyon alacsony S1R affinitiással rendelkező paroxetin kezeléssel a FLU-hoz hasonló protektív hatások nem válthatók ki [195, 404].

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 posztiszkémiás túlélés és vesefunkció hátterében, ami felveti a S1R, mint új ígéretes gyógyszer célpont relevanciáját az AKI terápiájában.

Az IRI károsodás a KTx során a grafttúlélés egyik legfontosabb faktora, a DGF meghatározó tényezője. A kiterjesztett donorkritériumok alapján eltávolított szervek még érzékenyebbek az IRIre, és bár elkerülhetetlen, de kiemelt fontosságú a tárolás alatt bekövetkező károsodás csökkentése.

A S1R agonista kezelés ígéretes eredményeiből kiindulva, a S1R agonisták alkalmazási lehetőségét autotranszplantált KTx modelljében is vizsgáltuk. Az autotranszplantációs modell lényege, hogy az eltávolított szervet ugyanabba az állatba helyezzük vissza, így elkerülhető az immunválasz, illetve a későbbi immunszuppresszív terápia okozta nefrotoxicitás hatása, melyek jelentősen befolyásolhatják a graft működését és túlélését. Ebben a modellben az IRI károsító hatása elkülönítve, más faktoroktól függetlenül vizsgálható.

Irodalmi adatok alapján kísérleteinkben a CIT-et 2 órában állapítottuk meg, mert emellett az idő mellett, a visszaültetést követően jelentősen csökkentek a vesefunkciós paraméterek [405]. A KTx kimenetelének javítására fejlesztendő eljárásoknál elterjedten használják a donor állatok előkezelését [405, 406]. Mi szándékosan a prezervációs folyadék összetételének változtatását céloztuk meg, mert a donor kezelése cadaver donáció esetén - ami még mindig az átültetések közel 80%-a - nem használható. Mindemellett a donor kezelése szisztémás beavatkozás, míg a S1R agonista prezervációs folyadékba történő adásával csak lokális, a graftot érő hatást idézünk elő.

Az adagolást az IRI vizsgálatokban alkalmazott hatékony dózisból (20 mg/tskg) extrapolálva számoltuk ki. MS-HPLC méréssel vesehomogenizátumból visszaigazoltuk, hogy a FLU egyszeri 20 mg/tskg intraperitoneális adagolást követően 0,846 ug/ml koncentrációban, míg a prezervációs folyadékban 2 órán át történő tárolás után ezzel összemérhető mennyiségben, 0,643 ug/ml koncentrációban mutatható ki.

A klinikai gyakorlatban a maximális CIT hosszának megállapítása nagymértékben szerv, ország - és centrumfüggő: vese esetében maximum 48 órán belül, de optimálisan 16 óra alatt sor kell kerüljön a KTx-re [407]. Irodalmi adatok alapján a graftok szövettani károsodása 6-8 órás hideg iszkémiát követően a legkifejezettebb [405] kísérleteinkben ezért több időintervallumot (2, 3 8, és 24 órát) alkalmaztunk az optimális és a még tolerálható ideig tartó CIT okozta károsodás vizsgálatára.

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. Kiemelendő, hogy a S1R tartalmú folyadékban tárolt vesék esetében még 24 óra elteltével sem detektáltunk olyan mértékű szöveti károsodást, mint a kontroll oldatban már 2 órás tárolást követően. Ez több szempontból is nagyon fontos különbség, egyrész a S1R tartalmú oldat hosszabb tárolást tesz lehetővé, a szerv szükség esetén messzebbre szállítható, több idő van a legmegfelelőbb donor-recipiens egyezés felkutatására, a műtéti felkészítésre. Másik oldalról ugyanannyi idő alatt enyhébb károsodás alakul ki a FLU-tartalmú oldatban. Ez azért különösen jelentős, mert a populáció idősödésével nem csak a várólistán lévő betegek általános állapota rosszabb, de a donorok életkorának növekedésével a beültetésre váró graftok is esetenként rosszabb állapotúak, tehát nem mindegy, hogy milyen további károsodást szenvednek el a hideg tárolás alatt.

A S1R agonisták renoprotektív hatása megmaradt a KTx-et követően is. A FLU tartalmú prezervációs folyadékban tárolt veséket kapó állatokban 24 órával az átültetést követően alacsonyabb volt a retenciós paraméterek és az AST szintje, csökkent a *Kim-1* és *NGAL* renális mRNS expressziója. Ebben a modellben nem a vizelettel ürülő KIM-1 és NGAL fehérje mennyiségét mértük, hanem a renális expressziót, mert néhány esetben (különösen a kezeletlen csoportban) az első 24 órában még nem volt elegendő vizelete az állatoknak.

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 parameter tekintetében kedvezőbbnek bizonyult a FLU-nál. A beültetett graftban a perfúzió két-foton mikroszkóppal történő vizsgálatával többször sikertelenül próbálkoztunk, következőkben Doppler ultrahanggal vagy renális fMRI-vel tervezzük tanulmányozni a véráramlás változását. A vizsgálatok jelenleg is folynak, további méréseket végzünk egyrészt a molekuláris mechanizmus tisztázására, másrészt változtajuk a tárolási körülményeket, emeljük a hőmérsékeletet és tervezzük egy egy perfúziós készülék beszerzését, mellyel a folyamatos machine-perfusion megvalósítható.

Állatkísérleteink bizonyították, 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 KTx sikerét. A dolgozatban bemutatott adatokból készült "medical device" típusú szabadalmi beadvány (PCT/HU2017/050051), mely a S1R agonisták prezervációs folyadékban történő alkalmazásának jótékony hatásait írja le már nemzetközi fázisban van, bejegyzése az egyes országokban 2020 végén kezdődik.

dc_1685_19 VII. 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:

- 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.
- 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-kel és MR antagonistákkal végzett hosszútávú kezelés is hatékony a T1DM-hez társuló depresszió terápiájában.
- 4. Igazoltuk, hogy mindegyik RAASi növeli a hippokampuszban 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 prekurzor 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 kulcsmehanizmusa 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.
- 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 sérülékenységhez 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 fibronektin) 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 lozartánnal történő kombinált kezelésben.
- 16. Elsőként írtuk le a S1R expressziós mintázatát különböző nefronszegmensekben. 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 dózisfüggő 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 direkten gátolják a fibroblasztok proliferációját, illetve az ECM komponensek termelését. Az antagonista 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 hátterében, 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.

dc_1685_19 VIII. SUMMARY AND NOVEL FINDINGS

- 1. We determined that hyperglycemia provokes depressive-like behavior and neuroendocrine alterations in T1DM. We established the roles of the S1R-BDNF signaling pathway and various BDNF isoforms in the pathomechanism of depression.
- 2. We showed that long-term FLU therapy is effective in the treatment of T1DM-associated depression. We verified the role of S1R activation in the antidepressant action of FLU.
- 3. We were the first to prove that long-term treatment with ARBs as well as ACEi and MR antagonists is effective in the therapy of T1DM-associated depression.
- 4. We determined that the pro-apoptotic pathway is less significant and the antidepressant effect of RAASi is independent of precursor BDNF - p75Ntr - JNK - Bax signaling. Moreover, we showed that all RAASi increase protein levels of the TrkB - Erk - CREB - Bcl2 signaling pathway in the hippocampus, thereby promoting neuronal survival, regeneration and synapsis formation.
- 5. We demonstrated that RAASi are renoprotective in monotherapy, in a non-depressor dose. They mitigate renal functional decline and have an antifibrotic effect in the rat model of T1DM-induced DKD. We showed that efficacy of MR antagonists in monotherapy is similar, or in certain parameters superior to other RAASi, possibly due to the blockade of aldosteroneescape.
- 6. We introduced Protein Fingerprint[™] peptides to follow the efficacy of anti-fibrotic therapy in DKD. We confirmed that these biomarkers correlate well with histological damage and are ample indicators of renal fibrosis.
- 7. We verified that RAASi treatment directly inhibits fibroblast/myofibroblast transformation, which suggests that these cells may be a primary therapeutic target of RAASi.
- 8. We showed that increased protein O-GlcNAcylation is a key mechanism of glucotoxicity. We determined various isoforms of O-GlcNAcylation enzymes and their temporal alterations. We established that peNOS levels decrease in response to hyperglycemia, possibly due to its increased O-GlcNAcylation.

- 9. We determined that RAASi treatment reduces protein *O*-GlcNAcylation. This effect is not caused by decreased levels of OGT, but rather by OGA-L increment, which is responsible for the removal of *O*-GlcNAc moieties.
- 10. We confirmed that NKA becomes dysfunctional in hyperglycemia due to translocation from its physiological location to the cytoplasm. HSP72 is co-localized with NKA and its decreased quantities lead to vulnerability to glucotoxicity. RAASi treatment prevents NKA translocation.
- 11. We showed that DAPA effectively and safely (without severe hypo- or hyperglycemic episodes) diminishes renal functional decline and structural deterioration. Levels of specific tubular injury markers KIM-1 and NGAL, as well as urinary biomarkers of fibrosis (rProC3 and TUM) also decreased.
- 12. We demonstrated that DAPA effectively abates DM-induced fibrotic response. DAPA blocks pro-fibrotic *Ctgf* and *Pdgf* production, thus curtailing myofibroblast transformation and the production of ECM components (collagens and fibronectin).
- 13. We showed both in proximal tubular cells and whole kidneys that DAPA treatment reduces hyperglycemia-induced *O*-GlcNAcylation primarily by inhibiting OGT, the enzyme responsible for synthesis.
- 14. Hypoxia develops in parallel with hyperglycemia and induces pro-fibrotic factor production in the kidney. We demonstrated that DAPA treatment reduces these factors, and is thus involved in the prevention of fibrosis and renal functional deterioration by mitigating hypoxic injury.
- 15. We established that DAPA is similarly effective in monotherapy as in combination with a non-depressor dose of losartan in both *in vivo* and *in vitro* experiments.
- 16. We were the first to describe the expression pattern of S1R in various nephron segments. The receptor can be found in the cortex in high quantities and to a lesser extent in the medulla and papilla.

- 17. We demonstrated the anti-fibrotic effect of S1R agonists in the kidney. We showed that FLU effectively mitigates renal functional deterioration in DKD, reduces microalbuminuria and ECM production in a dose-dependent manner.
- 18. We showed that not only FLU, but also other more specific S1R agonists (SA4503, PRE-084) directly inhibit fibroblast proliferation and ECM component production. Addition of an antagonist suspended the improvement, which confirms that the renoprotective effect is S1R-mediated.
- 19. We verified that estrogen induces S1R translocation from the perinuclear region to the cytoplasm. Due to this, production of heat shock response proteins (HSF-1, HSP72, HSP27) is promoted. In females NKA function and localization are more preserved after an ischemic insult, which can in part be attributed to more robust chaperone activity.
- 20. We demonstrated the protective role of FLU treatment against renal IRI. We described a novel molecular pathway where S1R translocation induces Akt NO mediated vasodilation. Activation of this pathway improves post-ischemic survival and kidney function, which suggests that S1R could be a promising new target for the treatment of AKI.
- 21. We demonstrated that irrespective of the original preservation fluid, addition of S1R agonists improves short- and mid-term graft function and minimizes hypoxic tissue injury, thereby improving KTx outcomes.

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

Angol nyelvű:

 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, Barczi 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 diabetesinduced 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, Kőrösi 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. σ1-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:

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 alapkutatás 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 ischaemiareperfúziós károsodás okozta akut veseelégtelenségben: a Na/K-ATPáz szerepe. Hypertonia Nephrologia 2005;(1); 53-54.

KÖNYVFEJEZETEK:

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

dc_1685_19 X. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ÖSSZEGZÉSE

Tudományos és oktatási közlemények	our of the second secon	Száma Hiustkovások1			
	Összesen	Részletezve	Független	Összes	
- Folvóiratcikk ²	79				
szakcikk pemzetközi folvóiratban, idegen nyelvű		55	1433	1686	
szakcikk hazai idegen nyelvű	0.000	1	1	2	
szakcikk magyar nyelyű	· · · · ·	6	6	6	
szakcikk sokszerzős érdemi szerzőkénl ³		0	0	0	
összefoglaló közlemény	9	15	144	153	
résid közlemény	1008	2	0	0	
I Känni	0	2	U	v	
a) Szakkóma: kézikóma: tankóma: szarzőként	0			5-100	
ideoon punkil	v		0	0	
maguar nyahu		0	0	0	
nayya nyelvu		0	0	0	
ad) Felsooktatasi taihonyy		-	U	0	
szerkesztőként	0		. 500		
idegen nyelvű	1222	0	, <u>199</u>	1000	
magyar nyelvű	15	0		() () () ()	
bb) Felsőoktatási tankönyv	3 19 70	0	1.000	1	
II. Könyrészlet	7		-		
idegen nyelvű	a 1922	4	0	0	
magyar nyelvű	3 44	1	0	0	
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	3	2	0	0	
V. Konferenciaközlemény ⁴	0	8	0	0	
Oktatási közlemények összesen (II.aa.bb-III.cc)		2	0	0	
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)		84	1584	1847	
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	86		1584	1847	
V További tudományos művek	35	1			
További tudományos művek, ide értve a nem telies		26	2	2 2.02	
folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megialent teles folyóiratrikkeket is	1.2	32	0	0	
Szerkesztőséni levelezés hozzászólások válaszok	0.000	0	0	0	
Oltalmak szabadalmak		3	0	0	
Onannak, szabadannak	5400	2		<u> </u>	
VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	1		1	1	
Összes hivatkozás ¹	2 10	×	1585	1848	
Hirsch index ⁶	23	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	3	37.200 5 	
ringen ninga	42	17.94	1000	-2998 X	
g index*	43		5775	8.95	
Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás			
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	11	301	0 0		
Itolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	17	102	57 74		
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2004) teljes	70	1171	5-		
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált udomávos folyóiratcikkeinek száma	48	524			
A legmagasabb hivatkozóttságú közlemény hivatkozásainak	393	21,27%			
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		138			
Jelentés, quideline	0	0	57		
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0	19. 		
Speciális tudománymetriai adatok Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ² Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ² A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2004) teljes tudományos folyóiratcikkek száma Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudomáyos folyóiratcikkeinek száma A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozáts százalékában) Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben Jelentés, guideline Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	Száma 11 17 70 48 393 0 0	Összes hivatkozás 301 102 1171 524 21,27% 138 0 0 0			

Fekete Andrea tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.09.28)

dc_1685_19 XI. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. Cho, N.H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045.* Diabetes Res Clin Pract, 2018. **138**: p. 271-281.
- 2. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **94**(3): p. 311-21.
- 3. Jermendy, G., et al., *Prevalence rate of diabetes mellitus and impaired fasting glycemia in Hungary: cross-sectional study on nationally representative sample of people aged 20-69 years.* Croat Med J, 2010. **51**(2): p. 151-6.
- 4. Jermendy, G., et al., A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegek kezelése és gondozása a felnőttkorban, in A Magyar Diabétesz Társaság szakmai irányelve. 2011: Diabetologia Hungarica. p. 5-72.
- 5. American Diabetes, A., Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. Diabetes Care, 2018. 41(5): p. 917-928.
- 6. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S5-S10.
- Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med, 1998. 15(7): p. 539-53.
- 8. Pinhas-Hamiel, O. and P. Zeitler, Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. Lancet, 2007. 369(9575): p. 1823-31.
- 9. Narayan, K.M., et al., Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. JAMA, 2003. 290(14): p. 1884-90.
- 10. Scheen, A.J., Pathophysiology of type 2 diabetes. Acta Clin Belg, 2003. 58(6): p. 335-41.
- 11. Tulassay, Z., A belgyógyászat alapjai 2. 2010.
- 12. Wittmann, I., Diabetológia jegyzet orvostanhallgatók számára.
- 13. Zendjabil, M., Biological diagnosis of diabetes mellitus. Pathol Biol (Paris), 2015.
- 14. Gaál, Z., et al., Egészségügyi szakmai irányelv A diabetes mellitus kórismézéséről, a cukorbetegek antihyperglykaemiás kezeléséről és gondozásáról felnőttkorban Diabetologia Hungarica, 2017. 25(1): p. 3-77.
- 15. Szollár, L., A szénhidrát anyagcsere zavarai. Kórélettan. 2005, Budapest: Semmelweis Kiadó. 187-207.
- 16. Kikkawa, R., Chronic complications in diabetes mellitus. Br J Nutr, 2000. 84 Suppl 2: p. S183-5.
- 17. IDF Diabetes Atlas 4th. 2009.
- 18. Foley, R.N., et al., Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(2): p. 489-95.
- 19. Andrade, L., et al., *The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys.* Int J Methods Psychiatr Res, 2003. **12**(1): p. 3-21.
- 20. Kopp, M., Berghammer, R.,, Orvosi Pszichológia. 2005: p. 309-321.
- 21. Dieleman, J.L., et al., US Spending on Personal Health Care and Public Health, 1996-2013. JAMA, 2016. 316(24): p. 2627-2646.
- 22. Collaborators, G.B.D.U.H.C., Measuring universal health coverage based on an index of effective coverage of health services in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet, 2020.
- 23. APA, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 2000: Washington, DC.
- 24. WHO, Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. 1992: Geneva, Switzerland.
- 25. Kollégium, P.S., Az Egészségügyi Minisztérium Szakmai Protokollja. 2008.
- 26. Zung, W.W., A Self-Rating Depression Scale. Arch Gen Psychiatry, 1965. 12: p. 63-70.
- 27. Zigmond, A.S. and R.P. Snaith, *The hospital anxiety and depression scale*. Acta Psychiatr Scand, 1983. **67**(6): p. 361-70.
- 28. Beck, A.T., et al., An inventory for measuring depression. Arch Gen Psychiatry, 1961. 4: p. 561-71.
- 29. Hidasi, Z., P. Salacz, and É. Csibri, Depresszió neuropszichiátriai betegségekben Összefoglaló közlemény. Ideggyogy Sz, 2012(65(1-2)): p. 6-15.

- 30. Sheline, Y.I., et al., *Hippocampal atrophy in recurrent major depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 3908-13.
- 31. Sanacora, G., et al., *Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders.* Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(5): p. 426-37.
- 32. Willis, T., Diabetes: A Medical Odyssey. New York: Tuckahoe 1971.
- 33. Rubin, R.R. and M. Peyrot, *Was Willis right? Thoughts on the interaction of depression and diabetes.* Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18**(3): p. 173-5.
- 34. Anderson, R.J., et al., *The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis*, in *Diabetes Care*. 2001. p. 1069-78.
- 35. Eaton, W.W., et al., *Depression and risk for onset of type II diabetes. A prospective population-based study.* Diabetes Care, 1996. **19**(10): p. 1097-102.
- 36. Mezuk, B., et al., *Depression and type 2 diabetes over the lifespan: a meta-analysis.* Diabetes Care, 2008. **31**(12): p. 2383-90.
- 37. de Groot, M., et al., Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. Psychosom Med, 2001.
 63(4): p. 619-30.
- 38. Foss-Freitas, M.C., et al., *Evaluation of cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1150**: p. 290-6.
- Rapoport, M.J., et al., *TH1/TH2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients*. Cytokine, 2005. 30(5): p. 219-27.
- 40. Li, J., M. Huang, and X. Shen, *The association of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with hyperglycemic crisis.* J Diabetes Complications, 2014. **28**(5): p. 662-6.
- 41. Maury, E. and S.M. Brichard, *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 1-16.
- 42. Trottier, M.D., et al., *Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(20): p. 7622-9.
- 43. Felger, J.C. and F.E. Lotrich, *Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications*. Neuroscience, 2013. 246: p. 199-229.
- 44. Chandler, S., et al., Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. J Neuroimmunol, 1997. 72(2): p. 155-61.
- 45. Menard, C., et al., *Social stress induces neurovascular pathology promoting depression*. Nat Neurosci, 2017. **20**(12): p. 1752-1760.
- 46. Valdearcos, M., et al., *Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility.* Cell Metab, 2018. **27**(6): p. 1356.
- 47. Raison, C.L., L. Capuron, and A.H. Miller, *Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression*. Trends Immunol, 2006. **27**(1): p. 24-31.
- 48. Stuart, M.J. and B.T. Baune, *Depression and type 2 diabetes: inflammatory mechanisms of a psychoneuroendocrine co-morbidity.* Neurosci Biobehav Rev, 2012. **36**(1): p. 658-76.
- 49. Jarnum, H., et al., Longitudinal MRI study of cortical thickness, perfusion, and metabolite levels in major depressive disorder. Acta Psychiatr Scand, 2011. **124**(6): p. 435-46.
- 50. Tiemeier, H., et al., *Cerebral haemodynamics and depression in the elderly*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **73**(1): p. 34-9.
- 51. Direk, N., et al., *Cerebral hemodynamics and incident depression: the Rotterdam Study*. Biol Psychiatry, 2012. **72**(4): p. 318-23.
- 52. Mirabito Colafella, K.M., D.M. Bovée, and A.H.J. Danser, *The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets*. Exp Eye Res, 2019. **186**: p. 107680.
- 53. Johnston, C.I. and J. Risvanis, *Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues.* Am J Hypertens, 1997. **10**(12 Pt 2): p. 306S-310S.
- 54. Welches, W.R., K.B. Brosnihan, and C.M. Ferrario, *A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11.* Life Sci, 1993. **52**(18): p. 1461-80.

- 55. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium*. *Fibrosis and renin-angiotensinaldosterone system*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1849-65.
- 56. Steckelings, U.M., E. Kaschina, and T. Unger, *The AT2 receptor--a matter of love and hate*. Peptides, 2005. **26**(8): p. 1401-9.
- 57. Sakai, K. and C.D. Sigmund, *Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain.* Curr Hypertens Rep, 2005. 7(2): p. 135-40.
- 58. Ganten, D., R. Boucher, and J. Genest, *Renin activity in brain tissue of puppies and adult dogs*. Brain Res, 1971. 33(2): p. 557-9.
- 59. Schelling, P., et al., A micromethod for the measurement of renin in brain nuclei: its application in spontaneously hypertensive rats. Neuropharmacology, 1982. 21(5): p. 455-63.
- 60. Iwai, N. and T. Inagami, *Quantitative analysis of renin gene expression in extrarenal tissues by polymerase chain reaction method.* J Hypertens, 1992. **10**(8): p. 717-24.
- 61. Hermann, K., et al., *Presence of renin in primary neuronal and glial cells from rat brain*. Brain Res, 1987. **437**(2): p. 205-13.
- 62. Phillips, M.I. and B. Stenstrom, Angiotensin II in rat brain comigrates with authentic angiotensin II in high pressure liquid chromatography. Circ Res, 1985. 56(2): p. 212-9.
- 63. Iovino, M., et al., Brain Angiotensinergic Regulation of the Immune System: Implications for Cardiovascular and Neuroendocrine Responses. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2020. 20(1): p. 15-24.
- 64. Craft, S. and G.S. Watson, *Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms*. Lancet Neurol, 2004. **3**(3): p. 169-78.
- 65. Crandall, E.A., M.A. Gillis, and J.D. Fernstrom, *Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats*. Endocrinology, 1981. **109**(1): p. 310-2.
- 66. Manjarrez, G., et al., A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory-evoked potentials. Diabetes Care, 2006. **29**(1): p. 73-7.
- 67. Rosenthal, J.M., et al., *The effect of acute hypoglycemia on brain function and activation: a functional magnetic resonance imaging study.* Diabetes, 2001. **50**(7): p. 1618-26.
- 68. Kan, C., et al., A systematic review and meta-analysis of the association between depression and insulin resistance. Diabetes Care, 2013. **36**(2): p. 480-9.
- 69. Mann, J.J., et al., Suicide prevention strategies: a systematic review. JAMA, 2005. 294(16): p. 2064-74.
- 70. Okamura, F., et al., Insulin resistance in patients with depression and its changes during the clinical course of depression: minimal model analysis. Metabolism, 2000. **49**(10): p. 1255-60.
- 71. Nemeroff, C.B., et al., Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study. Arch Gen Psychiatry, 1992. **49**(5): p. 384-7.
- 72. Yudkin, J.S., et al., Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? Atherosclerosis, 2000. 148(2): p. 209-14.
- 73. Roy, M.S., et al., *The ovine corticotropin-releasing hormone-stimulation test in type I diabetic patients and controls:* suggestion of mild chronic hypercortisolism. Metabolism, 1993. **42**(6): p. 696-700.
- 74. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J, 1982. 1(5): p. 549-53.
- 75. Lu, B., P.T. Pang, and N.H. Woo, The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci, 2005. 6(8): p. 603-14.
- 76. Sairanen, M., et al., Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. J Neurosci, 2005. 25(5): p. 1089-94.
- 77. Cunha, C., R. Brambilla, and K.L. Thomas, *A simple role for BDNF in learning and memory*? Front Mol Neurosci, 2010. **3**: p. 1.
- 78. Lee, R., et al., Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science, 2001. 294(5548): p. 1945-8.
- 79. Hempstead, B.L., *Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2015. **126**: p. 9-19.
- 80. Yu, H. and Z.Y. Chen, *The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry*. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(1): p. 3-11.

- 81. Castren, E., V. Voikar, and T. Rantamaki, *Role of neurotrophic factors in depression*. Curr Opin Pharmacol, 2007. 7(1): p. 18-21.
- 82. Schroter, K., et al., *Longitudinal multi-level biomarker analysis of BDNF in major depression and bipolar disorder*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2020. **270**(2): p. 169-181.
- 83. Matrisciano, F., et al., Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. J Psychiatr Res, 2009. 43(3): p. 247-54.
- 84. Molendijk, M.L., et al., Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). Mol Psychiatry, 2014. **19**(7): p. 791-800.
- 85. Rao, A.A., et al., *Bioinformatics analysis of functional protein sequences reveals a role for brain-derived neurotrophic factor in obesity and type 2 diabetes mellitus.* Med Hypotheses, 2008. **70**(2): p. 424-9.
- 86. Yamanaka, M., et al., Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ameliorates glucose metabolism and prevents pancreatic exhaustion in diabetic mice. J Biosci Bioeng, 2008. **105**(4): p. 395-402.
- 87. Yu, Y., Q. Wang, and X.F. Huang, Energy-restricted pair-feeding normalizes low levels of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B mRNA expression in the hippocampus, but not ventromedial hypothalamic nucleus, in dietinduced obese mice. Neuroscience, 2009. 160(2): p. 295-306.
- 88. Park, H.R., et al., A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. Neurosci Lett, 2010. 482(3): p. 235-9.
- 89. Krabbe, K.S., et al., *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(2): p. 431-8.
- 90. Li, B., N. Lang, and Z.F. Cheng, Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor Are Associated with Diabetes Risk, Complications, and Obesity: a Cohort Study from Chinese Patients with Type 2 Diabetes. Mol Neurobiol, 2016. 53(8): p. 5492-9.
- 91. Boyuk, B., et al., *Relationship between levels of brain-derived neurotrophic factor and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus.* J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 978143.
- 92. Passaro, A., et al., *Brain-derived neurotrophic factor plasma levels: relationship with dementia and diabetes in the elderly population.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(3): p. 294-302.
- 93. Kekuda, R., et al., *Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(2): p. 553-8.
- 94. Maurice, T., C. Grégoire, and J. Espallergues, *Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigmal (sigmal) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection.* Pharmacol Biochem Behav, 2006. **84**(4): p. 581-97.
- 95. Hayashi, T. and T.P. Su, Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. Cell, 2007. **131**(3): p. 596-610.
- 96. Bhuiyan, M.S., H. Tagashira, and K. Fukunaga, Dehydroepiandrosterone-mediated stimulation of sigma-1 receptor activates Akt-eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. Cardiovasc Ther, 2011. 29(4): p. 219-30.
- 97. Su, T.P., et al., *The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(12): p. 557-66.
- 98. Ossa, F., J.R. Schnell, and J.L. Ortega-Roldan, A Review of the Human Sigma-1 Receptor Structure. Adv Exp Med Biol, 2017. 964: p. 15-29.
- 99. Maurice, T., F.J. Roman, and A. Privat, Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF-10,047 binding to sigma 1 receptors in the mouse forebrain. J Neurosci Res, 1996. 46(6): p. 734-43.
- Fukunaga, K. and S. Moriguchi, Stimulation of the Sigma-1 Receptor and the Effects on Neurogenesis and Depressive Behaviors in Mice. Adv Exp Med Biol, 2017. 964: p. 201-211.
- 101. Peviani, M., et al., Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. Neurobiol Dis, 2014. 62: p. 218-32.
- 102. Kikuchi-Utsumi, K. and T. Nakaki, Chronic treatment with a selective ligand for the sigma-1 receptor chaperone, SA4503, up-regulates BDNF protein levels in the rat hippocampus. Neurosci Lett, 2008. 440(1): p. 19-22.
- 103. Takebayashi, M., T. Hayashi, and T.P. Su, *A perspective on the new mechanism of antidepressants: neuritogenesis through sigma-1 receptors.* Pharmacopsychiatry, 2004. **37 Suppl 3**: p. S208-13.

- 104. Yao, H., et al., *Platelet-derived growth factor B chain is a novel target gene of cocaine-mediated Notchl signaling: implications for HIV-associated neurological disorders.* J Neurosci, 2011. **31**(35): p. 12449-54.
- 105. Dhir, A. and S. Kulkarni, Involvement of sigma (sigma1) receptors in modulating the anti-depressant effect of neurosteroids (dehydroepiandrosterone or pregnenolone) in mouse tail-suspension test. J Psychopharmacol, 2008. 22(6): p. 691-6.
- Sabino, V., et al., Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype. Behav Brain Res, 2009. 198(2): p. 472-6.
- 107. Fujimoto, M., et al., *Sigma-1 receptor chaperones regulate the secretion of brain-derived neurotrophic factor*. Synapse, 2012. **66**(7): p. 630-9.
- Hodrea, J., et al., A diabeteshez társuló depresszió patomechanizmusa. Magyar Belorvosi Archívum, 2013. 66: p. 5.
- 109. U S Renal Data System, USRDS 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. 2010, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.
- 110. Vallance, P. and J. Leiper, *Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1023-30.
- 111. Saran, R., et al., US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Am J Kidney Dis, 2020. **75**(1 Suppl 1): p. A6-A7.
- 112. Viberti, G.C., et al., *Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus*. Lancet, 1982. 1(8287): p. 1430-2.
- 113. GELLMAN, D.D., et al., *Diabetic nephropathy: a clinical and pathologic study based on renal biopsies.* Medicine (Baltimore), 1959. **38**: p. 321-67.
- 114. Mogensen, C.E., *How to protect the kidney in diabetic patients: with special reference to IDDM.* Diabetes, 1997.
 46 Suppl 2: p. S104-11.
- 115. Thomas, M.C., et al., *Diabetic kidney disease*. Nat Rev Dis Primers, 2015. 1: p. 15018.
- 116. Wada, J. and H. Makino, *Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Clin Sci (Lond), 2013.
 124(3): p. 139-52.
- Fekete, A. and A. Vannay, *A diabeteses nephropathia jelentősége gyermekkorban*. Orvosi Hetilap, 2014. 155: p.
 9.
- 118. Donaghue, K.C., et al., ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. Microvascular and macrovascular complications. Pediatr Diabetes, 2007. 8(3): p. 163-70.
- 119. Tabaei, B.P., et al., *Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy?* Diabetes Care, 2001. 24(9): p. 1560-6.
- 120. Perkins, B.A., et al., *Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1353-61.
- 121. Nakamura, T., et al., Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant, 2000. 15(9): p. 1379-83.
- 122. Bolignano, D., et al., Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. 4(2): p. 337-44.
- 123. Nielsen, S.E., et al., *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril.* Diabet Med, 2010. **27**(10): p. 1144-50.
- Wright, E.M., B.A. Hirayama, and D.F. Loo, *Active sugar transport in health and disease*. J Intern Med, 2007. 261(1): p. 32-43.
- 125. Gerich, J.E., Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. Diabet Med, 2010. **27**(2): p. 136-42.
- 126. Vallon, V., et al., *SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule*. J Am Soc Nephrol, 2011.
 22(1): p. 104-12.
- 127. Wood, I.S. and P. Trayhurn, *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins.* Br J Nutr, 2003. **89**(1): p. 3-9.

- 128. Vallon, V., *The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus*. Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 255-70.
- 129. Mogensen, C.E., Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamcis during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects. Scand J Clin Lab Invest, 1971. 28(1): p. 101-9.
- 130. Tahrani, A.A., A.H. Barnett, and C.J. Bailey, *SGLT inhibitors in management of diabetes*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2013. **1**(2): p. 140-51.
- 131. Vallon, V., *The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(5): p. R1009-22.
- 132. Vallon, V., et al., Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(12): p. 2569-76.
- 133. Vallon, V. and S.C. Thomson, *Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney.* Annu Rev Physiol, 2012. **74**: p. 351-75.
- 134. Hsieh, T.J., et al., *High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells.* Endocrinology, 2002. **143**(8): p. 2975-85.
- 135. Zimpelmann, J., et al., *Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat.* Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2320-30.
- 136. Mazak, I., et al., Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2792-800.
- 137. Siragy, H.M. and C. Xue, *Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats.* Exp Physiol, 2008. **93**(7): p. 817-24.
- Rentoukas, E.I., G.A. Lazaros, and P.N. Zirogiannis, *Aldosterone in Heart and Kidney Diseases*. Hellenic Journal of Cardiology, 2005(46): p. 408-419.
- 139. Wells, L., S.A. Whelan, and G.W. Hart, *O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 435-41.
- 140. Hart, G.W., et al., Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 825-58.
- 141. Marshall, S., V. Bacote, and R.R. Traxinger, Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. J Biol Chem, 1991. 266(8): p. 4706-12.
- 142. Akimoto, Y., et al., Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. Glycobiology, 2007. 17(2): p. 127-40.
- Liu, K., et al., Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(6): p. 2820-5.
- 144. Whelan, S.A., M.D. Lane, and G.W. Hart, *Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21411-7.
- 145. Ngoh, G.A., et al., O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. Circ Res, 2010. 107(2): p. 171-85.
- 146. Kolm-Litty, V., et al., *High glucose-induced transforming growth factor betal production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells.* J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 160-9.
- 147. Goldberg, H.J., J. Scholey, and I.G. Fantus, *Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 863-71.
- 148. Wolf, G., et al., *High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy.* Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 2): p. F348-56.
- 149. James, L.R., et al., *Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1146-56.
- Korner, A., et al., Increased renal metabolism in diabetes. Mechanism and functional implications. Diabetes, 1994. 43(5): p. 629-33.
- Palm, F., et al., Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. Diabetologia, 2003. 46(8): p. 1153-60.
- 152. Ries, M., et al., *Renal diffusion and BOLD MRI in experimental diabetic nephropathy. Blood oxygen leveldependent.* J Magn Reson Imaging, 2003. **17**(1): p. 104-13.

- Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis*. Curr Opin Genet Dev, 1998. 8(5): p. 588-94.
- 154. Fine, L.G., D. Bandyopadhyay, and J.T. Norman, *Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia.* Kidney International, 2000. **57**: p. S22-S26.
- 155. Kang, D.H., et al., *Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2002.
 13(3): p. 806-16.
- 156. Eckardt, K.U., et al., Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. Blood Purif, 2003. 21(3): p. 253-7.
- 157. Orphanides, C., L.G. Fine, and J.T. Norman, *Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism*. Kidney Int, 1997. **52**(3): p. 637-47.
- 158. Higgins, D.F., et al., *Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2004. **287**(6): p. F1223-F1232.
- 159. Wynn, T.A., Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest, 2007. 117(3): p. 524-9.
- 160. Meran, S. and R. Steadman, *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. Int J Exp Pathol, 2011. **92**(3): p. 158-67.
- 161. Karihaloo, A., Anti-fibrosis therapy and diabetic nephropathy. Curr Diab Rep, 2012. 12(4): p. 414-22.
- 162. Zhou, D., et al., *Kidney tubular beta-catenin signaling controls interstitial fibroblast fate via epithelialmesenchymal communication.* Sci Rep, 2013. **3**: p. 1878.
- 163. Genovese, F., et al., *The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis?* Fibrogenesis Tissue Repair, 2014. 7(1): p. 4.
- Strippoli, G.F., et al., *Clinical and therapeutic aspects of diabetic nephropathy*. J Nephrol, 2003. 16(4): p. 487-99.
- 165. Ohkubo, Y., et al., Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. Diabetes Res Clin Pract, 1995. **28**(2): p. 103-17.
- 166. Baltatzi, M., C. Savopoulos, and A. Hatzitolios, *Role of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in hypertension of chronic kidney disease and renoprotection. Study results.* Hippokratia, 2011. **15**(Suppl 1): p. 27-32.
- 167. Bilous, R., et al., *Effect of candesartan on microalbuminuria and albumin excretion rate in diabetes: three randomized trials.* Ann Intern Med, 2009. **151**(1): p. 11-20, W3-4.
- 168. Phillips, C.O., et al., *Adverse effects of combination angiotensin II receptor blockers plus angiotensin-converting enzyme inhibitors for left ventricular dysfunction: a quantitative review of data from randomized clinical trials.* Arch Intern Med, 2007. **167**(18): p. 1930-6.
- 169. Schjoedt, K.J., et al., *Beneficial impact of spironolactone on nephrotic range albuminuria in diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2006. **70**(3): p. 536-42.
- 170. Chamberlain, J.J., et al., *Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes* Association Standards of Medical Care in Diabetes. Ann Intern Med, 2016. **164**(8): p. 542-52.
- 171. RamachandraRao, S.P., et al., *Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2009.
 20(8): p. 1765-75.
- Pergola, P.E., et al., *Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2011.
 365(4): p. 327-36.
- 173. de Zeeuw, D., et al., Rationale and trial design of Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes: the Occurrence of Renal Events (BEACON). Am J Nephrol, 2013. **37**(3): p. 212-22.
- 174. Perkovic, V., et al., *Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy*. N Engl J Med, 2019. **380**(24): p. 2295-2306.
- Kulcsár, I., et al., *Dialíziskezelés Magyarországon: 2003-2009*. Hypertonia és Nephrologia, 2010. 14: p. 247-253.
- 176. Ponticelli, C., *Renal transplantation 2004: where do we stand today?* Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(12): p. 2937-47.

- 177. Szolgálat, O.V., Nemzeti Szervdonációs Regiszter. 2019.
 - 178. Legendre, C., G. Canaud, and F. Martinez, *Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation*. Transpl Int, 2014. **27**(1): p. 19-27.
 - 179. Catena, F., et al., *Kidney preservation: review of present and future perspective*. Transplant Proc, 2013. **45**(9): p. 3170-7.
 - 180. Ponticelli, C., Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(6): p. 1134-40.
 - 181. Nieuwenhuijs-Moeke, G.J., et al., Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair. J Clin Med, 2020. 9(1).
 - 182. Fekete, A., et al., Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. J Physiol, 2004. 555(Pt 2): p. 471-80.
 - Bonventre, J.V. and L. Yang, Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. J Clin Invest, 2011. 121(11): p. 4210-21.
 - 184. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
 - Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr Physiol, 2012.
 2(2): p. 1303-53.
 - 186. Betz, B., et al., Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. PPAR Res, 2012. 2012: p. 219319.
 - 187. Luo, F., et al., *Mitogen-Activated Protein Kinases and Hypoxic/Ischemic Nephropathy*. Cell Physiol Biochem, 2016. **39**(3): p. 1051-67.
 - 188. Aufricht, C., HSP: helper, suppressor, protector. Kidney Int, 2004. 65(2): p. 739-40.
 - Smoyer, W.E., et al., Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins. J Am Soc Nephrol, 2000. 11(2): p. 211-21.
 - 190. Chebotareva, N., I. Bobkova, and E. Shilov, *Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy*. Cell Stress Chaperones, 2017. **22**(3): p. 319-343.
 - Chu, U.B. and A.E. Ruoho, *Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor*. Mol Pharmacol, 2016. 89(1): p. 142-53.
 - 192. Ajmo, C.T., Jr., et al., Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. Curr Neurovasc Res, 2006. **3**(2): p. 89-98.
 - 193. Allahtavakoli, M. and B. Jarrott, Sigma-1 receptor ligand PRE-084 reduced infarct volume, neurological deficits, pro-inflammatory cytokines and enhanced anti-inflammatory cytokines after embolic stroke in rats. Brain Res Bull, 2011. **85**(3-4): p. 219-24.
 - 194. Bhuiyan, M.S., et al., *Targeting sigma-1 receptor with fluvoxamine ameliorates pressure-overload-induced hypertrophy and dysfunctions*. Expert Opin Ther Targets, 2010. **14**(10): p. 1009-22.
 - 195. Tagashira, H., et al., Sigmal-receptor stimulation with fluvoxamine ameliorates transverse aortic constrictioninduced myocardial hypertrophy and dysfunction in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 299(5): p. H1535-45.
 - 196. Klouz, A., et al., Protection of cellular and mitochondrial functions against liver ischemia by N-benzyl-N'-(2hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl)-piperazine (BHDP), a sigmal ligand. Eur J Pharmacol, 2008. **578**(2-3): p. 292-9.
 - 197. Fukami, K., et al., *Ramipril inhibits AGE-RAGE-induced matrix metalloproteinase-2 activation in experimental diabetic nephropathy.* Diabetol Metab Syndr, 2014. **6**(1): p. 86.
 - 198. Zhang, L., et al., *Lefty-1 alleviates TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast transdifferentiation in NRK-*49F cells. Drug Des Devel Ther, 2015. 9: p. 4669-78.
 - 199. Xiao, X., et al., Aldosterone induces NRK-52E cell apoptosis in acute kidney injury via rno-miR-203 hypermethylation and Kim-1 upregulation. Exp Ther Med, 2016. **12**(2): p. 915-924.
 - 200. Failli, P., et al., Losartan counteracts the hyper-reactivity to angiotensin II and ROCK1 over-activation in aortas isolated from streptozotocin-injected diabetic rats. Cardiovasc Diabetol, 2009. 8: p. 32.
 - 201. Taira, M., et al., Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensinaldosterone system in diabetic rats. Eur J Pharmacol, 2008. **589**(1-3): p. 264-71.

- 202. Coppey, L.J., et al., ACE inhibitor or angiotensin II receptor antagonist attenuates diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes, 2006. 55(2): p. 341-8.
- 203. O'Sullivan, J.B. and S.B. Harrap, *Resetting blood pressure in spontaneously hypertensive rats. The role of bradykinin.* Hypertension, 1995. **25**(2): p. 162-5.
- Hao, L., et al., *Effects of eplerenone on heart and kidney in two-kidney, one-clip rats.* Am J Nephrol, 2004. 24(1):
 p. 54-60.
- 205. Banki, N.F., et al., Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. PLoS One, 2012. 7(6): p. e39938.
- 206. Nair, A.B. and S. Jacob, *A simple practice guide for dose conversion between animals and human*. J Basic Clin Pharm, 2016. 7(2): p. 27-31.
- 207. Müller, V., et al., *Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin.* Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1364-71.
- 208. Pittenger, C. and R.S. Duman, *Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms.* Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(1): p. 88-109.
- 209. Porsolt, R.D., M. Le Pichon, and M. Jalfre, *Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.* Nature, 1977. 266(5604): p. 730-2.
- 210. Slattery, D.A. and J.F. Cryan, *Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents.* Nat Protoc, 2012. 7(6): p. 1009-14.
- Bronikowski, A.M., et al., Open-field behavior of house mice selectively bred for high voluntary wheel-running. Behav Genet, 2001. 31(3): p. 309-16.
- 212. Kolset, S.O., F.P. Reinholt, and T. Jenssen, *Diabetic nephropathy and extracellular matrix*. J Histochem Cytochem, 2012. **60**(12): p. 976-86.
- Nasri, H., et al., Ameliorative effect of melatonin against contrast media induced renal tubular cell injury. Pak J Med Sci, 2014. 30(2): p. 261-5.
- 214. Junquiera, L.C., L.C. Junqueira, and R.R. Brentani, *A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen*. Anal Biochem, 1979. **94**(1): p. 96-9.
- Lenart, L., et al., *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. 233(7): p. 1269-78.
- 216. Zelena, D., et al., *Hypothalamic paraventricular nucleus, but not vasopressin, participates in chronic hyperactivity of the HPA axis in diabetic rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(2): p. E243-50.
- 217. Polyakova, M., et al., *BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis.* J Affect Disord, 2015. **174**: p. 432-40.
- 218. Liu, W., et al., Brain derived neurotrophic factor in newly diagnosed diabetes and prediabetes. Mol Cell Endocrinol, 2016. **429**: p. 106-13.
- 219. Korczak, D.J., et al., *Type 1 diabetes mellitus and major depressive disorder: evidence for a biological link*. Diabetologia, 2011. **54**(10): p. 2483-93.
- 220. Ahola, A.J., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone-blockade is associated with decreased use of antidepressant therapy in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy.* Acta Diabetol, 2014.
- 221. Pavlatou, M.G., et al., *Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamicpituitary-adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: preliminary results.* Stress, 2008. **11**(1): p. 62-72.
- 222. Lenart, L., et al., Novel therapeutic potential of angiotensin receptor 1 blockade in a rat model of diabetesassociated depression parallels altered BDNF signalling. Diabetologia, 2019. **62**(8): p. 1501-1513.
- 223. Suzuki, C., et al., *Quantitation of rat cerebral blood flow using (99m)Tc-HMPAO*. Nucl Med Biol, 2017. **47**: p. 19-22.
- 224. Carson, M.J., J.C. Thrash, and B. Walter, *The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival.* Clin Neurosci Res, 2006. **6**(5): p. 237-245.
- 225. Balogh, D.B., et al., Antidepressant effect in diabetes-associated depression: A novel potential of RAAS inhibition. Psychoneuroendocrinology, 2020. 118: p. 104705.

- 226. Maeda, C.Y., et al., Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. Braz J Med Biol Res, 1995. 28(4): p. 497-501.
- 227. Hashimoto, M., et al., *Investigation on diabetic autonomic neuropathy assessed by power spectral analysis of heart rate variability in WBN/Kob rats.* J Electrocardiol, 2001. **34**(3): p. 243-50.
- 228. Dias, L.D., et al., *Renal denervation in an animal model of diabetes and hypertension: impact on the autonomic nervous system and nephropathy.* Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 33.
- 229. Koszegi, S., et al., *RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition.* J Physiol, 2019. **597**(1): p. 193-209.
- 230. Du, X., et al., *Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of renal interstitial fibrosis in mouse obstructive nephropathy.* Laboratory Investigation, 2012. **92**: p. 1149.
- 231. Hinz, B. and G. Gabbiani, *Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts*. Curr Opin Biotechnol, 2003. 14(5): p. 538-46.
- Keshav, R. and U. Narayanappa, *Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Oral Submucous Fibrosis: An Immunohistochemical Study*. Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR, 2015. 9(5): p. ZC20-ZC23.
- 233. Gellai, R., et al., *Role of O-linked N-acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy.* Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(6): p. F1172-f1181.
- 234. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
- 235. Fekete, A., et al., *Na+,K+-ATPase is modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney--another reason for diabetic nephropathy*? J Physiol, 2008. **586**(22): p. 5337-48.
- 236. Hodrea, J., et al., *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. **318**(4): p. F1017-F1029.
- 237. Rusai, K., et al., *Effect of inhibition of neuronal nitric oxide synthase and L-arginine supplementation on renal ischaemia-reperfusion injury and the renal nitric oxide system*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. 35(10): p. 1183-9.
- 238. Hosszu, A., et al., *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. **31**(11): p. 1268-1278.
- 239. Vannay, A., et al., Dehydroepiandrosterone pretreatment alters the ischaemia/reperfusion-induced VEGF, IL-1 and IL-6 gene expression in acute renal failure. Kidney Blood Press Res, 2009. **32**(3): p. 175-84.
- 240. Vannay, A., et al., *Effects of histamine and the h2 receptor antagonist ranitidine on ischemia-induced acute renal failure: involvement of IL-6 and vascular endothelial growth factor.* Kidney Blood Press Res, 2004. **27**(2): p. 105-13.
- 241. Hosszu, A., et al., sigmal-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Soc Nephrol, 2017. 28(1): p. 152-165.
- 242. Islam, S.M., L.B. Rawal, and L.W. Niessen, *Prevalence of depression and its associated factors in patients with type 2 diabetes: A cross-sectional study in Dhaka, Bangladesh.* Asian J Psychiatr, 2015. **17**: p. 36-41.
- 243. Egede, L.E. and C. Ellis, *Diabetes and depression: global perspectives*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(3): p. 302-12.
- 244. Markowitz, S.M., et al., *A review of treating depression in diabetes: emerging findings*. Psychosomatics, 2011. **52**(1): p. 1-18.
- 245. Cryan, J.F., R.J. Valentino, and I. Lucki, Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. Neurosci Biobehav Rev, 2005. 29(4-5): p. 547-69.
- 246. Detke, M.J., M. Rickels, and I. Lucki, *Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants.* Psychopharmacology (Berl), 1995. **121**(1): p. 66-72.
- 247. Nadeem, R.I., H.I. Ahmed, and E.E. El-Denshary, *Effect of Imipramine, Paroxetine, and Lithium Carbonate on Neurobehavioral Changes of Streptozotocin in Rats: Impact on Glycogen Synthase Kinase-3 and Blood Glucose Level.* Neurochem Res, 2015. **40**(9): p. 1810-8.
- 248. Caletti, G., et al., Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. Amino Acids, 2012. 43(4): p. 1525-33.
- 249. Sanchez, C. and E. Meier, *Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike?* Psychopharmacology (Berl), 1997. **129**(3): p. 197-205.

- 250. Kamei, J., et al., *Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice.* Pharmacol Biochem Behav, 2003. **75**(2): p. 247-54.
- 251. Benmansour, S., et al., *Comparison of the effects of estradiol and progesterone on serotonergic function*. Biol Psychiatry, 2012. **71**(7): p. 633-41.
- 252. de Jong, T.R., et al., *Effects of chronic treatment with fluvoxamine and paroxetine during adolescence on serotonin-related behavior in adult male rats.* Eur Neuropsychopharmacol, 2006. **16**(1): p. 39-48.
- 253. Lyttle, K., et al., *Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats.* Brain Res, 2015. **1616**: p. 88-100.
- 254. Sugimoto, Y., et al., Mouse strain differences in immobility and sensitivity to fluvoxamine and desipramine in the forced swimming test: analysis of serotonin and noradrenaline transporter binding. Eur J Pharmacol, 2008. 592(1-3): p. 116-22.
- 255. Zelena, D., et al., *The role of vasopressin in chronic stress studied in a chronic mild stress model of depression*. Ideggyogy Sz, 2007. **60**(3-4): p. 196-200.
- 256. Cai, L., et al., Antidepressant-like effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats by regulating the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Eur Neuropsychopharmacol, 2015. 25(8): p. 1332-41.
- 257. Freire-Garabal, M., et al., *Effects of fluoxetine on the immunosuppressive response to stress in mice*. Life Sci, 1997. **60**(26): p. PL403-13.
- 258. Kioukia-Fougia, N., et al., *The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2002. **26**(5): p. 823-30.
- 259. Narita, N., et al., *Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain*. Eur J Pharmacol, 1996. **307**(1): p. 117-9.
- 260. Matsuno, K., et al., Sigma 1 receptor subtype is involved in the relief of behavioral despair in the mouse forced swimming test. Eur J Pharmacol, 1996. **312**(3): p. 267-71.
- 261. Sugimoto, Y., et al., *Involvement of the sigmal receptor in the antidepressant-like effects of fluvoxamine in the forced swimming test in comparison with the effects elicited by paroxetine*. Eur J Pharmacol, 2012. **696**(1-3): p. 96-100.
- Voican, C.S., et al., Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. Am J Psychiatry, 2014. 171(4):
 p. 404-15.
- 263. Yamada, J., Y. Sugimoto, and K. Inoue, *Selective serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and fluvoxamine induce hyperglycemia by different mechanisms*. Eur J Pharmacol, 1999. **382**(3): p. 211-5.
- 264. Oswald, P., D. Souery, and J. Mendlewicz, *Fluvoxamine-induced hyperglycaemia in a diabetic patient with comorbid depression*. Int J Neuropsychopharmacol, 2003. **6**(1): p. 85-7.
- 265. Reddy, V.S., et al., *Relationship between serum low-density lipoprotein cholesterol and in-hospital mortality following acute myocardial infarction (the lipid paradox).* Am J Cardiol, 2015. **115**(5): p. 557-62.
- 266. Tse, L., et al., *Pharmacological treatment of antipsychotic-induced dyslipidemia and hypertension*. Int Clin Psychopharmacol, 2014. **29**(3): p. 125-37.
- 267. de Zwaan, M. and D.O. Nutzinger, *Effect of fluvoxamine on total serum cholesterol levels during weight reduction*. J Clin Psychiatry, 1996. **57**(8): p. 346-8.
- 268. Beyazyuz, M., et al., Relationship between SSRIs and Metabolic Syndrome Abnormalities in Patients with Generalized Anxiety Disorder: A Prospective Study. Psychiatry Investig, 2013. 10(2): p. 148-54.
- 269. Ahola, A.J., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone-blockade is associated with decreased use of antidepressant therapy in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy.* Acta Diabetol, 2014. **51**(4): p. 529-33.
- 270. Aswar, U., et al., *Telmisartan attenuates diabetes induced depression in rats*. Pharmacol Rep, 2017. **69**(2): p. 358-364.
- 271. Dinh, Q.N., et al., Aldosterone-induced oxidative stress and inflammation in the brain are mediated by the endothelial cell mineralocorticoid receptor. Brain Res, 2016. 1637: p. 146-153.
- 272. Nagayach, A., N. Patro, and I. Patro, *Astrocytic and microglial response in experimentally induced diabetic rat brain*. Metab Brain Dis, 2014. **29**(3): p. 747-61.
- 273. Bhat, S.A., et al., Angiotensin Receptor Blockade by Inhibiting Glial Activation Promotes Hippocampal Neurogenesis Via Activation of Wnt/beta-Catenin Signaling in Hypertension. Mol Neurobiol, 2018. 55(6): p. 5282-5298.

- Bhat, S.A., et al., Angiotensin Receptor Blockade Modulates NFkappaB and STAT3 Signaling and Inhibits Glial Activation and Neuroinflammation Better than Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. Mol Neurobiol, 2016. 53(10): p. 6950-6967.
- Kishi, T., Y. Hirooka, and K. Sunagawa, *Telmisartan protects against cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B in hippocampus of hypertensive rats.* J Cardiol, 2012. 60(6): p. 489-94.
- 276. Ali, M.R., et al., *Tempol and perindopril protect against lipopolysaccharide-induced cognition impairment and amyloidogenesis by modulating brain-derived neurotropic factor, neuroinflammation and oxido-nitrosative stress.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016. **389**(6): p. 637-56.
- 277. Ali, Q., R. Sabuhi, and T. Hussain, *High glucose up-regulates angiotensin II subtype 2 receptors via interferon regulatory factor-1 in proximal tubule epithelial cells.* Molecular and cellular biochemistry, 2010. **344**(0): p. 65-71.
- 278. Nakagawa, T., *Diabetic nephropathy: Aldosterone breakthrough in patients on an ACEI*. Nat Rev Nephrol, 2010.
 6(4): p. 194-6.
- Schjoedt, K.J., et al., Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. Diabetologia, 2004. 47(11): p. 1936-9.
- 280. Epstein, M., *Aldosterone blockade: an emerging strategy for abrogating progressive renal disease.* Am J Med, 2006. **119**(11): p. 912-9.
- 281. Dhillon, S., *Eplerenone: a review of its use in patients with chronic systolic heart failure and mild symptoms.* Drugs, 2013. **73**(13): p. 1451-62.
- 282. Alexandrou, M.E., et al., *Effects of mineralocorticoid receptor antagonists in proteinuric kidney disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.* J Hypertens, 2019. **37**(12): p. 2307-2324.
- 283. Goenka, L., R. Padmanaban, and M. George, *The Ascent of Mineralocorticoid Receptor Antagonists in Diabetic Nephropathy*. Curr Clin Pharmacol, 2018.
- 284. Kato, S., et al., Anti-albuminuric effects of spironolactone in patients with type 2 diabetic nephropathy: a multicenter, randomized clinical trial. Clin Exp Nephrol, 2015. **19**(6): p. 1098-106.
- 285. Nielsen, S.E., et al., Spironolactone diminishes urinary albumin excretion in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria: a randomized placebo-controlled crossover study. Diabet Med, 2012. **29**(8): p. e184-90.
- 286. De Angelis, K., M.C. Irigoyen, and M. Morris, *Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models*. Auton Neurosci, 2009. **145**(1-2): p. 3-10.
- Guo, C., et al., Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. Circulation, 2008. 117(17): p. 2253-61.
- 288. Matsumoto, S., K. Takebayashi, and Y. Aso, *The effect of spironolactone on circulating adipocytokines in patients with type 2 diabetes mellitus complicated by diabetic nephropathy.* Metabolism, 2006. **55**(12): p. 1645-52.
- 289. Goyal, B.R., et al., *Investigation into the cardiac effects of spironolactone in the experimental model of type 1 diabetes.* J Cardiovasc Pharmacol, 2009. **54**(6): p. 502-9.
- 290. Johansen, M.L., et al., *Effect of the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone on liver fat and metabolism in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial (MIRAD trial).* Diabetes Obes Metab, 2019. **21**(10): p. 2305-2314.
- 291. Makhlough, A., et al., *Effect of spironolactone on diabetic nephropathy compared to the combination of spironolactone and losartan*. Nephrourol Mon, 2014. **6**(1): p. e12148.
- 292. Mavrakanas, T.A., et al., *Effect of ramipril alone compared to ramipril with eplerenone on diabetic nephropathy in streptozocin-induced diabetic rats.* Pharmacology, 2010. **86**(2): p. 85-91.
- De Blasio, M.J., et al., The superoxide dismutase mimetic tempol blunts diabetes-induced upregulation of NADPH oxidase and endoplasmic reticulum stress in a rat model of diabetic nephropathy. Eur J Pharmacol, 2017.
 807: p. 12-20.
- 294. Han, S.Y., et al., *Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1362-72.
- 295. Kang, Y.S., et al., *Effect of eplerenone, enalapril and their combination treatment on diabetic nephropathy in type II diabetic rats.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(1): p. 73-84.

- 296. Wang, J., et al., *Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice.* Cell Biochem Biophys, 2013. **67**(2): p. 537-46.
- 297. Takamiya, Y., et al., *Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 55-62.
- Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease.* Am J Physiol, 1999.
 277(1 Pt 1): p. C1-9.
- Leask, A. and D. Abraham, *TGF-β signaling and the fibrotic response*. The FASEB Journal, 2004. 18(7): p. 816-827.
- 300. Yamamoto, T., et al., *Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(5): p. 1814-1818.
- 301. Huang, J., L.C. Matavelli, and H.M. Siragy, *Renal (pro)renin receptor contributes to development of diabetic kidney disease through TGFβ1-CTGF signaling cascade*. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2011. 38(4): p. 215-221.
- 302. Feldman, D.L., et al., *Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats.* Hypertension, 2008. **52**(1): p. 130-6.
- 303. Di Paolo, S., et al., *High glucose concentration induces the overexpression of transforming growth factor-beta through the activation of a platelet-derived growth factor loop in human mesangial cells.* The American Journal of Pathology, 1996. **149**(6): p. 2095-2106.
- 304. Li, X., et al., *ACEI attenuates the progression of CCl(4)-induced rat hepatic fibrogenesis by inhibiting TGF-β1, PDGF-BB, NF-κB and MMP-2,9.* World Journal of Gastroenterology : WJG, 2005. **11**(31): p. 4807-4811.
- 305. Nishioka, T., et al., *Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation.* J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **49**(5): p. 261-8.
- 306. Macunluoglu, B., et al., *Effects of Spironolactone in an Experimental Model of Chronic Cyclosporine Nephrotoxicity*. Transplantation Proceedings, 2008. **40**(1): p. 273-278.
- 307. Lipson, K.E., et al., *CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis.* Fibrogenesis & Tissue Repair, 2012. **5**(Suppl 1): p. S24-S24.
- 308. Murphy, M., et al., Suppression Subtractive Hybridization Identifies High Glucose Levels as a Stimulus for Expression of Connective Tissue Growth Factor and Other Genes in Human Mesangial Cells. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(9): p. 5830-5834.
- 309. Andersen, S., et al., *Reduction of urinary connective tissue growth factor by Losartan in type 1 patients with diabetic nephropathy.* Kidney International, 2005. **67**(6): p. 2325-2329.
- 310. Han, K.H., et al., *Spironolactone ameliorates renal injury and connective tissue growth factor expression in type II diabetic rats.* Kidney International, 2006. **70**(1): p. 111-120.
- 311. Hedberg, K.M., et al., *PDGF and neomycin induce similar changes in the actin cytoskeleton in human fibroblasts.* Cell Motil Cytoskeleton, 1993. **24**(2): p. 139-49.
- 312. Kuzuya, M., et al., *Pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, blocks vascular smooth muscle cell populated-collagen lattice contraction.* J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(6): p. 808-14.
- 313. Fuchshofer, R., et al., *Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury.* Histochemistry and Cell Biology, 2011. **136**(3): p. 301.
- 314. Park, K., C.D. Saudek, and G.W. Hart, *Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1845-50.
- 315. Ma, Z., D.J. Vocadlo, and K. Vosseller, *Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells.* J Biol Chem, 2013. **288**(21): p. 15121-30.
- Li, J., et al., *Isoforms of human O-GlcNAcase show distinct catalytic efficiencies*. Biochemistry (Mosc), 2010. 75(7): p. 938-43.
- 317. Kiss, E., et al., *Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia-induced renal damage: prevention by liver X receptors.* Am J Pathol, 2013. **182**(3): p. 727-41.
- James, L.R., et al., Angiotensin II activates the GFAT promoter in mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. 281(1): p. F151-62.

- 319. Hsieh, T.J., et al., *High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells.* Endocrinology, 2003. **144**(10): p. 4338-49.
- 320. Chatham, J.C., et al., *Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma.* Shock, 2008. **29**(4): p. 431-40.
- 321. Suh, H.N., et al., *Glucosamine-induced Sp1 O-GlcNAcylation ameliorates hypoxia-induced SGLT dysfunction in primary cultured renal proximal tubule cells.* J Cell Physiol, 2014. **229**(10): p. 1557-68.
- 322. Kazemi, Z., et al., O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. J Biol Chem, 2010. 285(50): p. 39096-107.
- 323. Arambašić, J., et al., *Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism.* Eur J Nutr, 2013. **52**(5): p. 1461-73.
- 324. Padmalayam, I., *The heat shock response: its role in pathogenesis of type 2 diabetes and its complications, and implications for therapeutic intervention.* Discov Med, 2014. **18**(97): p. 29-39.
- 325. Oksala, N.K., et al., Alpha-lipoic Acid modulates heat shock factor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. Antioxid Redox Signal, 2007. 9(4): p. 497-506.
- 326. Isenovic, E.R., et al., Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na+, K(+)-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. Int J Mol Med, 2004. **13**(6): p. 915-22.
- 327. Federici, M., et al., Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. Circulation, 2002. **106**(4): p. 466-72.
- 328. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site.* J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1341-8.
- 329. Beleznai, T. and Z. Bagi, Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. Vascul Pharmacol, 2012. 56(3-4): p. 115-21.
- 330. Toba, H., et al., Chronic treatment with recombinant human erythropoietin exerts renoprotective effects beyond hematopoiesis in streptozotocin-induced diabetic rat. Eur J Pharmacol, 2009. **612**(1-3): p. 106-14.
- 331. Kim, H.W., et al., *Long-term blockade of vascular endothelial growth factor receptor-2 aggravates the diabetic renal dysfunction associated with inactivation of the Akt/eNOS-NO axis*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(4): p. 1173-88.
- 332. Wanner, C., S.E. Inzucchi, and B. Zinman, *Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2016. 375(18): p. 1801-2.
- 333. Neal, B., et al., Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. N Engl J Med, 2017.
 377(7): p. 644-657.
- 334. Wiviott, S.D., I. Raz, and M.S. Sabatine, *Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. Reply.* N Engl J Med, 2019. 380(19): p. 1881-1882.
- 335. Heerspink, H.J.L., et al., *Kidney outcomes associated with use of SGLT2 inhibitors in real-world clinical practice (CVD-REAL 3): a multinational observational cohort study.* Lancet Diabetes Endocrinol, 2020. **8**(1): p. 27-35.
- 336. Oraby, M.A., et al., *Dapagliflozin attenuates early markers of diabetic nephropathy in fructose-streptozotocininduced diabetes in rats.* Biomed Pharmacother, 2019. **109**: p. 910-920.
- 337. Heerspink, H.J.L., et al., *Canagliflozin reduces inflammation and fibrosis biomarkers: a potential mechanism of action for beneficial effects of SGLT2 inhibitors in diabetic kidney disease*. Diabetologia, 2019. **62**(7): p. 1154-1166.
- 338. Huang, F., et al., *Dapagliflozin Attenuates Renal Tubulointerstitial Fibrosis Associated With Type 1 Diabetes by Regulating STAT1/TGFbeta1 Signaling*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 441.
- 339. Heerspink, H.J., et al., *Dapagliflozin reduces albuminuria in patients with diabetes and hypertension receiving renin-angiotensin blockers*. Diabetes Obes Metab, 2016. **18**(6): p. 590-7.
- 340. Weber, M.A., et al., *Effects of dapagliflozin on blood pressure in hypertensive diabetic patients on reninangiotensin system blockade.* Blood Press, 2016. **25**(2): p. 93-103.
- 341. Abdel-Wahab, A.F., et al., *Renal protective effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin alone and in combination with irbesartan in a rat model of diabetic nephropathy.* Biomed Pharmacother, 2018. **103**: p. 59-66.
- 342. Kojima, N., et al., *Renoprotective effects of combined SGLT2 and ACE inhibitor therapy in diabetic Dahl S rats.* Physiol Rep, 2015. **3**(7).

- 343. Singh, D.K., P. Winocour, and K. Farrington, *Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy.* Nat Clin Pract Nephrol, 2008. **4**(4): p. 216-26.
- 344. Gullans, S.R., S.I. Harris, and L.J. Mandel, *Glucose-dependent respiration in suspensions of rabbit cortical tubules*. J Membr Biol, 1984. **78**(3): p. 257-62.
- 345. Edlund, J., et al., *Reduced oxygenation in diabetic rat kidneys measured by T2* weighted magnetic resonance micro-imaging*. Adv Exp Med Biol, 2009. **645**: p. 199-204.
- 346. Kallio, P.J., et al., Activation of hypoxia-inducible factor lalpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5667-72.
- 347. Yu, W.M., et al., *Transcriptomic changes in human renal proximal tubular cells revealed under hypoxic conditions by RNA sequencing*. International Journal of Molecular Medicine, 2016. **38**(3): p. 894-902.
- 348. Fernandez-Martinez, A.B., et al., *Mutual regulation of hypoxic and retinoic acid related signalling in tubular proximal cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(8): p. 1198-207.
- 349. Leonard, M.O., et al., *The role of HIF-1 alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia.* J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40296-304.
- 350. Haase, V.H., *Hypoxia-inducible factors in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(2): p. F271-81.
- 351. Higgins, D.F., et al., *Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3810-20.
- 352. Ng, Y.Y., et al., *Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in* 5/6 nephrectomized rats. Kidney Int, 1998. **54**(3): p. 864-76.
- Sanchez-Elsner, T., et al., Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(42): p. 38527-38535.
- 354. Sanchez-Elsner, T., et al., A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. Journal of Molecular Biology, 2004. **336**(1): p. 9-24.
- 355. Higgins, D.F., et al., *Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(6): p. F1223-32.
- 356. Yoshida, D., et al., *Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells.* J Neurooncol, 2006. **76**(1): p. 13-21.
- 357. Lepeytre, F., et al., Association of Sex with Risk of Kidney Graft Failure Differs by Age. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(10): p. 3014-3023.
- 358. Aufhauser, D.D., Jr., et al., Improved renal ischemia tolerance in females influences kidney transplantation outcomes. J Clin Invest, 2016. **126**(5): p. 1968-77.
- 359. Xue, J.L., et al., *Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1135-42.
- 360. Fekete, A., et al., 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): p. F806-11.
- 361. Fekete, A., et al., Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. J Physiol, 2004. **555**(Pt 2): p. 471-80.
- 362. Hu, H., et al., Gender differences in the susceptibility to renal ischemia-reperfusion injury in BALB/c mice. Tohoku J Exp Med, 2009. 218(4): p. 325-9.
- 363. Park, K.M., et al., Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. J Biol Chem, 2004. 279(50): p. 52282-92.
- 364. Hutchens, M.P., et al., *Estrogen is renoprotective via a nonreceptor-dependent mechanism after cardiac arrest in vivo*. Anesthesiology, 2010. **112**(2): p. 395-405.
- 365. Wyatt, C.M., P.T. Coates, and W.B. Reeves, Of mice and women: do sex-dependent responses to ischemiareperfusion injury in rodents have implications for delayed graft function in humans? Kidney Int, 2016. 90(1): p. 10-3.
- 366. Liu, P.S. and P.Y. Wang, *DHEA attenuates catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells*. J Biomed Sci, 2004. **11**(2): p. 200-5.

- 367. Maninger, N., et al., *Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS)*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(1): p. 65-91.
- 368. Sanchez-Blazquez, P., et al., *The Sigma-1 Receptor Antagonist, S1RA, Reduces Stroke Damage, Ameliorates Post-Stroke Neurological Deficits and Suppresses the Overexpression of MMP-9.* Mol Neurobiol, 2018. **55**(6): p. 4940-4951.
- 369. Xu, Q., et al., Sigma-1 receptor in brain ischemia/reperfusion: Possible role in the NR2A-induced pathway to regulate brain-derived neurotrophic factor. J Neurol Sci, 2017. **376**: p. 166-175.
- 370. Wilbert-Lampen, U., et al., *Female sex hormones decrease constitutive endothelin-1 release via endothelial sigma-1/cocaine receptors: an action independent of the steroid hormone receptors.* Endothelium, 2005. **12**(4): p. 185-91.
- 371. Hayashi, T. and T.P. Su, Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. Cell, 2007. **131**(3): p. 596-610.
- 372. Knowlton, A.A. and L. Sun, *Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H455-64.
- 373. Voss, M.R., et al., *Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H687-92.
- 374. Labrie, F., et al., *Pure selective estrogen receptor modulators, new molecules having absolute cell specificity ranging from pure antiestrogenic to complete estrogen-like activities.* Adv Protein Chem, 2001. **56**: p. 293-368.
- 375. Buvat, J., Androgen therapy with dehydroepiandrosterone. World J Urol, 2003. 21(5): p. 346-55.
- 376. Feldman, H.A., et al., Low dehydroepiandrosterone and ischemic heart disease in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts Male Aging Study. Am J Epidemiol, 2001. **153**(1): p. 79-89.
- 377. Jimenez, M.C., et al., Low dehydroepiandrosterone sulfate is associated with increased risk of ischemic stroke among women. Stroke, 2013. 44(7): p. 1784-9.
- 378. Ayhan, S., et al., Dehydroepiandrosterone protects the microcirculation of muscle flaps from ischemiareperfusion injury by reducing the expression of adhesion molecules. Plast Reconstr Surg, 2003. 111(7): p. 2286-94.
- 379. Pelissier, M.A., et al., Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxydehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. Steroids, 2004. **69**(2): p. 137-44.
- 380. Mannic, T., J. Viguie, and M.F. Rossier, *In vivo and in vitro evidences of dehydroepiandrosterone protective role on the cardiovascular system*. Int J Endocrinol Metab, 2015. **13**(2): p. e24660.
- 381. Aragno, M., et al., Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. Kidney Int, 2003. 64(3): p. 836-43.
- 382. Hayashi, T., et al., *Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 782-92.
- 383. Simoncini, T., et al., *Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3449-55.
- 384. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3365-70.
- 385. Smith, G.L., et al., Worsening renal function: what is a clinically meaningful change in creatinine during hospitalization with heart failure? J Card Fail, 2003. 9(1): p. 13-25.
- 386. Zang, X., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cells in hypoxiareperfusion by reducing apoptosis.* Int Urol Nephrol, 2014. **46**(8): p. 1673-9.
- 387. Mussap, M., et al., *Emerging biomarkers and metabolomics for assessing toxic nephropathy and acute kidney injury (AKI) in neonatology*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 602526.
- 388. Bolignano, D., et al., Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. Am J Kidney Dis, 2008. 52(3): p. 595-605.
- 389. Han, W.K., et al., *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury.* Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 237-44.
- 390. Hacham, M., et al., *Different patterns of interleukin-lalpha and interleukin-lbeta expression in organs of normal young and old mice*. Eur Cytokine Netw, 2002. **13**(1): p. 55-65.
- 391. Luheshi, N.M., et al., Interleukin-1alpha expression precedes IL-1beta after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues. J Neuroinflammation, 2011. 8: p. 186.

- 392. Deng, J., et al., Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. Kidney Int, 2001. 60(6):
 p. 2118-28.
- 393. Jung, M., et al., Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin2. Kidney Int, 2012. 81(10): p. 969-82.
- 394. Yap, S.C. and H.T. Lee, *Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence*. Anesthesiology, 2012. **116**(5): p. 1139-48.
- 395. Allahtavakoli, M. and B. Jarrott, Sigma-1 receptor ligand PRE-084 reduced infarct volume, neurological deficits, pro-inflammatory cytokines and enhanced anti-inflammatory cytokines after embolic stroke in rats. Brain Res Bull, 2011. **85**(3-4): p. 219-24.
- 396. Bhuiyan, M.S., H. Tagashira, and K. Fukunaga, *Sigma-1 receptor stimulation with fluvoxamine activates Akte eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding.* Eur J Pharmacol, 2011. **650**(2-3): p. 621-8.
- 397. Tagashira, H., et al., Distinct cardioprotective effects of 17beta-estradiol and dehydroepiandrosterone on pressure overload-induced hypertrophy in ovariectomized female rats. Menopause, 2011. **18**(12): p. 1317-26.
- 398. Bhuiyan, M.S., H. Tagashira, and K. Fukunaga, *Crucial interactions between selective serotonin uptake inhibitors and sigma-1 receptor in heart failure*. J Pharmacol Sci, 2013. **121**(3): p. 177-84.
- 399. Roh, D.H., et al., Spinal neuronal NOS activation mediates sigma-1 receptor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in mice: involvement of PKC-dependent GluN1 phosphorylation. Br J Pharmacol, 2011. **163**(8): p. 1707-20.
- 400. Chaigneau, E., et al., *Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 13081-6.
- 401. Crawford, C., et al., An intact kidney slice model to investigate vasa recta properties and function in situ. Nephron Physiol, 2012. **120**(3): p. p17-31.
- 402. Smith, C., et al., *Splice variants of neuronal nitric oxide synthase are present in the rat kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(5): p. 1422-8.
- 403. Szabo, A.J., et al., *Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury*. Kidney Int, 2003. **64**(5): p. 1765-71.
- 404. Nishimura, T., et al., Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2558.
- 405. Shihab, F.S., W.M. Bennett, and T.F. Andoh, *Donor preconditioning with a calcineurin inhibitor improves outcome in rat syngeneic kidney transplantation*. Transplantation, 2009. **87**(3): p. 326-9.
- 406. Cicora, F., et al., Donor preconditioning with rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney transplantation. Transpl Immunol, 2012. **27**(1): p. 1-7.
- 407. Krezdorn, N., et al., Tissue conservation for transplantation. Innov Surg Sci, 2017. 2(4): p. 171-187.