

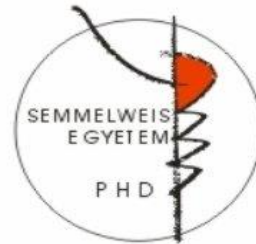
# Az O-GlcNAciláció jelentősége diabéteszes nefropátiában

Doktori értekezés

**Dr. Gellai Renáta**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Fekete Andrea, Ph.D, egyetemi tanársegéd
- Hivatalos bírálók: Dr. Deák György, Ph.D, osztályvezető főorvos  
Dr. Hosszúfalusi Nóra, Ph.D, egyetemi docens
- Bíráló bizottság elnöke: Dr. Mandl József, Ph.D, MTA rendes tagja
- Bíráló bizottság tagjai: Dr. Wagner Zoltán, Ph.D, főorvos  
Dr. Giricz Zoltán, Ph.D, tudományos főmunkatárs

Budapest

2016

## Tartalomjegyzék:

TARTALOMJEGYZÉK .....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. Diabétesz mellitusz (DM) .....	7
1.2. Diabéteszes nefropátia (DNP).....	12
1.2.1. Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS).....	15
1.2.2. A Na/K ATP-áz szerepe (NKA) .....	17
1.2.3. Akt-endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) rendszer .....	18
1.2.4. Hősokkfehérjék (HSPk) .....	18
1.2.5. A DNP kezelése .....	19
1.3. Fehérjék O-GlcNAcilációs módosulása .....	21
1.3.1. O-GlcNAciláció DM-ban .....	23
1.3.2. O-GlcNAciláció DNP-ben .....	24
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	26
3. MÓDSZEREK.....	27
3.1. <i>In vitro</i> modellek .....	27
3.2. 1-es típusú diabétesz (T1DM) patkánymodell .....	27
3.2.1. Vérnyomás-és pulzusmérés .....	29
3.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok .....	29
3.2.3. Vesék szövettani vizsgálata .....	29
3.3. Western blot analízis .....	30

3.4. Immunfluoreszcens festés .....	31
3.5. Statisztikai kiértékelés .....	32
4. EREDMÉNYEK.....	33
4.1. Hiperglikémia indukált O-GlcNAciláció és izoforma specifikus enzim- termelődés proximális tubulussejtekben .....	33
4.2. A peNOS fehérjemennyiség változása hiperglikémia hatására proximális tubulussejtekben.....	36
4.3. A NKA fehérjemennyiség változása proximális tubulussejtekben .....	37
4.4. A HSP72 lokalizáció és fehérjemennyiség változása magas glükóz hatására proximális tubulussejtekben.....	38
4.5. DNP kialakulása T1DM állatokban .....	40
4.6. A RAAS-gátlók hatása a fehérjék O-GlcNAcilációjára valamint az enzim izof ormákra diabéteszes vesében .....	43
4.7. A RAAS-gátlók hatása az eNOS foszforilációra diabéteszes vesében .....	46
4.8. HSP72 fehérjemennyiség és lokalizáció változása diabéteszes vesében .....	47
4.9. A NKA fehérjemennyiség és lokalizáció változása diabéteszes vesében .....	48
5. MEGBESZÉLÉS .....	50
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	57
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	58
8. SUMMARY .....	60
9. IRODALOMJEGYZÉK .....	61

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	73
10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények .....	73
10.2. Más témában megjelent közlemények .....	73
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	74

## Rövidítések jegyzéke:

ACE	Angiotenzin konvertáló enzim
AGE	Előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-products)
Ang	Angiotenzin
ARB	Angiotenzin receptor blokkoló
BSA	Bovine serum albumin
DM	Diabétesz mellitusz
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNP	Diabéteszes nefropátia
eNOS	Endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
GFR	Glomerulus filtrációs ráta
HbA <sub>1c</sub>	Hemoglobin-A <sub>1c</sub>
HBP	Hexózamin anyagcsere útvonal (hexosamine biosynthetic pathway)
IOD	Integrált optikai denzitás (integrated optical density)
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NO	Nitrogén-oxid
NF- $\kappa$ B	Nukleáris faktor-kappa B
OGA	N-acetil glükózaminidáz
O-GlcNAc	Oxigén-kapcsolt $\beta$ -N-glükózamin
OGT	O-GlcNAc transzferáz
OGTT	Orális glükóz tolerancia teszt
PKC	Protein kináz C

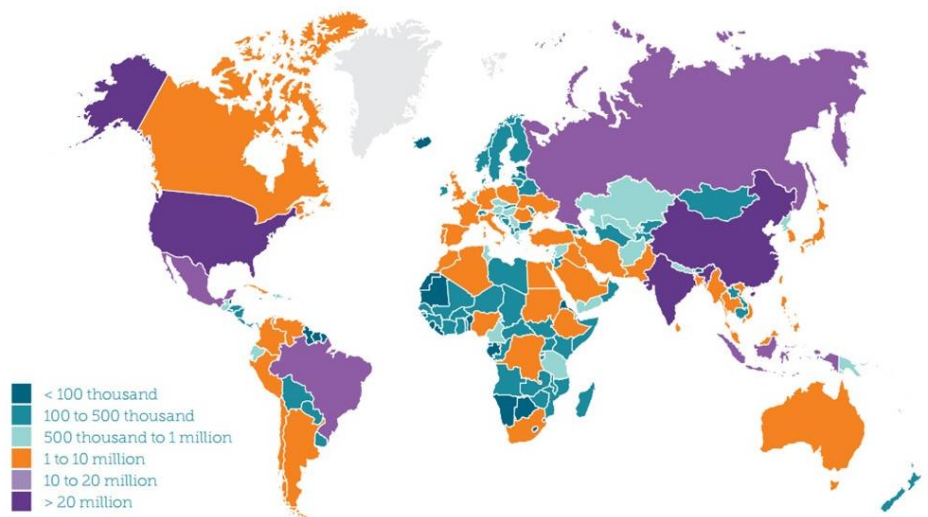
PAI	Plazminogén aktivátor inhibitor
ROS	Reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
SERCA	Szarkoplazmás retikulum kalcium ATP-áz
STZ	Streptozotocin
TBS	Tris-buffered saline
T1DM	1-es típusú diabétesz mellitusz
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz
TGF- $\beta$	Transzformáló növekedési faktor béta
UDP-GlcNAc	Uridin-difoszfo- <i>N</i> -acetilglükózamin
VEGF	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

# 1. Bevezetés Diabétesz mellitusz (DM)

## *Előfordulás:*

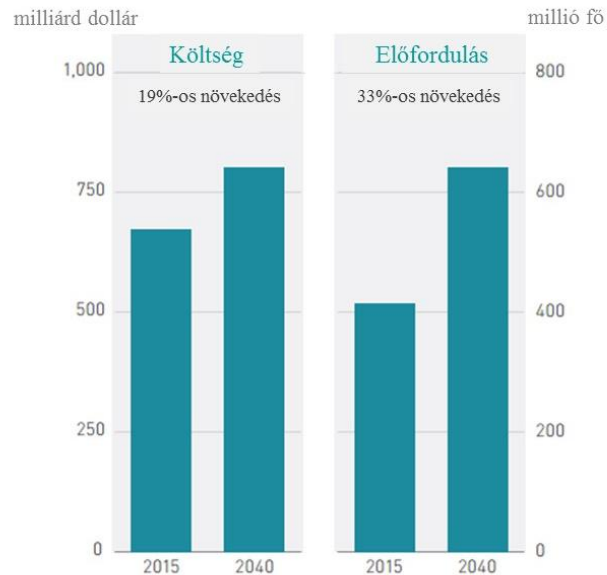
A cukorbetegség a szénhidrát-anyagcsere krónikus zavara, mely következményesen érinti a fehérje- és a zsíryanycserét, illetve a só-víz és sav-bázis háztartást is. Alapvető oka a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben lévő bétasejtek által termelt inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya, illetve az inzulin-hatás elmaradása. Ezáltal azok a sejtek, ahol a cukorfelvétel inzulinhatáshoz kötött (izom-, zsír- és májsejtek) nem képesek glükóz felvételére, a vércukor megemelkedik, melynek következtében létrejövő patofiziológiai eltérések számos szerv működését károsíthatják<sup>1; 2</sup>.

A cukorbetegség napjaink egyik legjelentősebb népegészségügyi problémája, mely súlyos társadalmi és gazdasági terhet jelent a fejlődő és fejlett országok számára egyaránt. A WHO adatai szerint jelenleg 415 millió ember szenved diabéteszben (DM) világszerte, azonban ha az eddigi növekedési tendencia folytatódik, ez a szám 2040-re 642 millióra emelkedhet - elsősorban a 2-es típusú DM (T2DM) járványszerű növekedése miatt<sup>3</sup> (1. ábra).



**1. ábra: A diabétesz mellitusz becsült előfordulása a felnőtt populációban 2015-ben<sup>3</sup>**

Mindezzel párhuzamosan a DM és szövődményeinek kezelésére fordított költségek is nőnek, mely fokozott terhet ró mind a betegekre, mind az egészségügyi rendszerre, és jelentős kihívás elé állítja a fejlődő országok szociális-gazdasági rendszerét (2. ábra).



**2. ábra: A diabétesz várható növekedése és a kezelésére fordított költségek** <sup>3</sup>

Magyarországon központi regiszter hiányában nem rendelkezünk pontos adatokkal a felnőttkori DM gyakoriságát illetően, azonban a nemzetközi adatok alapján hazánkban is jelentős növekedés várható. A hazai prevalencia-mutató 7,6-9,3% közötti, azonban a szűrővizsgálatok adatai alapján a nem diagnosztizált betegek aránya ugyanennyi lehet. Minden ismert betegre egy fel nem ismert diabéteszes beteg számolható <sup>4</sup>.

#### *Tünetek:*

A betegség klasszikus klinikai tünetei a poliúria (a vizelet mennyiségének megnövekedése a glükózúria miatti ozmotikus diurézis nyomán), a polidipszia (fokozott folyadékfelvétel az állandó szomjúságérzet miatt) és az egyéb okkal nem magyarázható fogyás, mely kialakulhat átlagos, fokozott (polifágia) vagy rossz étvágy mellett is. Jelentkezhet fáradtságérzés, hányinger, ami a ketózisra utalhat, időnként homályos látás, amelyet a szemlencsének a hiperozmoláris csarnokvíz miatt megváltozott fénytörése



okoz, illetve olykor lábikragörcs, valamint a kezujjakon zsibbadás. Visszatérő, nehezen gyógyuló infekciók is felhívhatják a figyelmet a cukorbetegségre. Súlyosabb esetben hiperglikémiás ketoacidózis vagy nem ketotikus hiperozmoláris állapot alakul ki, mely tudatzavarhoz, eszméletvesztéshez vezethet és kezelés nélkül halált okozhat.

A T2DM azonban gyakran tünetszegény és csak a szövődmények hívják fel a figyelmet a betegségre <sup>2; 5</sup>.

#### *Diagnózis:*

A DM kórisméje általában a klinikai tünetek keltette gyanú alapján, máskor szűrővizsgálatok keretén belül végzett, vagy családi halmozódás miatt indokolt vércukor-meghatározás alapján igazolódik.

#### DM állapítható meg, ha:

- az éhomi (8 órás éhezés után mért) vércukor  $\geq 7,0$  mmol/l,
- tipikus hiperglikémiás tünetek mellett mért alkalmi vércukor  $\geq 11,1$  mmol/l
- a hemoglobin A1c (HbA1c) értéke  $\geq 6,5\%$ ,
- orális glükóz toleranci teszt (OGTT) 2 órás értéke  $\geq 11,1$  mmol/l <sup>2; 6</sup>

#### *Csoportosítás:*

A betegségnek számos besorolása létezik.

*Etiológiai klasszifikáció* alapján megkülönböztetünk 1-es típusú DM-et (T1DM), melyben a béta-sejtek károsodása klasszikus klinikai tünetekkel manifesztálódik. Háttérben autoimmun folyamat szerepe, ill. genetikai fogékonyság feltételezhető, de idiopátiás formák is ismertek. A T2DM a leggyakoribb forma, az összes eset 90%-a. A perifériás inzulinrezisztencia miatt kialakuló relatív inzulinhiány jellemzi, melynek kialakulásában a genetikai fogékonyság mellett nagy szerepe van a környezeti tényezőknek. Típusos esetben klasszikus klinikai tünetek nélkül, elhízáshoz társulva, 35 éves kor fölött jelentkeznek, azonban az euro-atlanti társadalmakban az elhízás és a metabolikus szindróma terjedésével gyermekkorban is növekszik az előfordulása. Jelenleg pontos adatok a gyermekkori T2DM előfordulását illetően hiányosak <sup>7</sup>. Japánban és Taivanon a friss diabéteszesek több mint fele, míg az USA-ban közel egyharmada T2DM-be tartozik <sup>8</sup>.

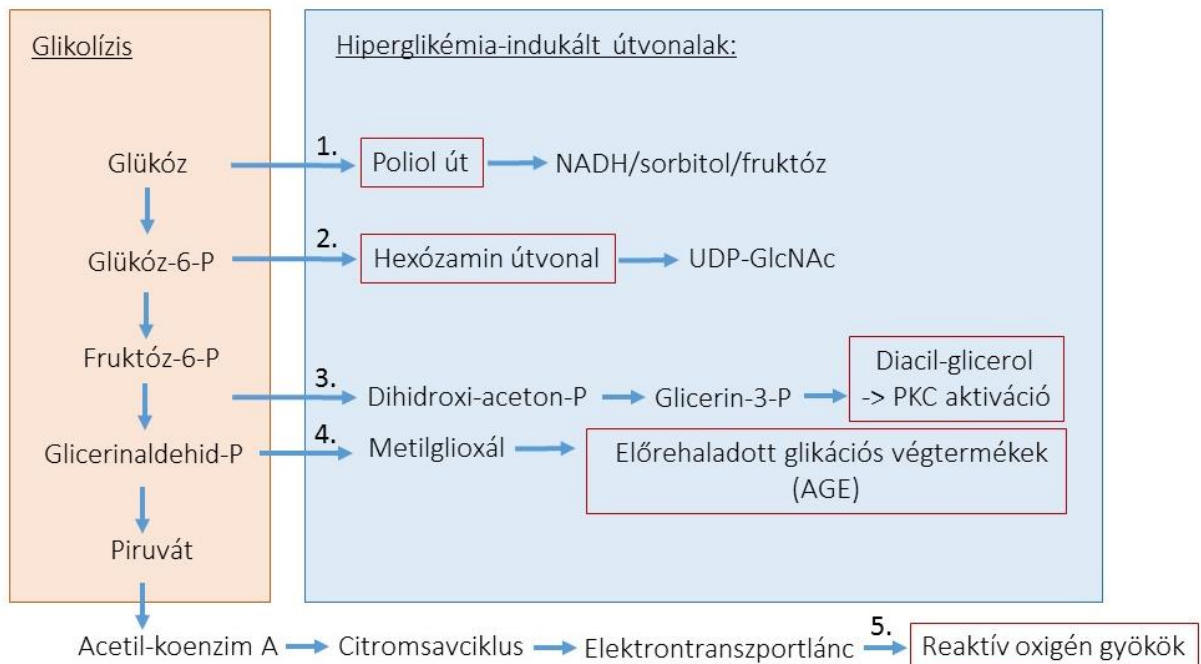
Külön entitás a terhességben manifesztálódó gesztációs diabétesz és ismertek egyéb ritkább, speciális DM formák is, melyeket itt részleteiben nem ismertetünk <sup>2;5</sup>.

*Szövődmények:*

A DM krónikus fennállása sokszervi szöveti károsodáshoz vezet. A nem-specifikus makroangiopátiás szövődmények alatt a nagyerek ateroszklerotikus károsodását értjük, mely számos kardiovaszkuláris megbetegedést okoz. A szem, idegek és nem utolsósorban a vese kiséreinek (retino-, nefro-és neuropátiás) károsodása során létrejövő mikroangiopátiás specifikus szövődmények 1-es, ill. 2-es típusban egyaránt kialakulhatnak. A vesekárosodás a kardiovaszkuláris szövődmények kialakulását is fokozza <sup>2</sup>. Míg DM-ben 3-6 szoros, addig DNP fennállása esetén 15-20-szoros a szív-érrendszeri szövődmények kialakulásának kockázata <sup>9</sup>.

*Patomechanizmus:*

Ismert, hogy a tartósan magas vércukorszint kulcsszerepet játszik a szövődmények kialakulásában. A glükotoxicitás közvetítéséért számos molekuláris mechanizmus felelőssé tehető: az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) képződése, a protein kináz C (PKC) aktiváció, illetve a poliol és hexózamin alternatív anyagcsere utak felerősödése egyaránt hozzájárul a károsodás kialakulásához<sup>10</sup>. A legfontosabb folyamatokat az alábbi ábra összegzi. (3. ábra)



### 3. ábra: A krónikus hiperglikémia által aktivált főbb molekuláris útvonalak.

Tartósan magas vércukorszint esetén a poliol (1) és hexózamin (2) alternatív anyagcsere utak felerősödése, protein kináz C (PKC) aktiváció (3), előrehaladott glikációs végtermékek (4) és reaktív oxigén gyökök képződése (5) következik be. A poliol út során a glükóz nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) felhasználásával fruktózzá alakul. A hexózamin út végtermékeként uridin-difoszfó-*N*-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc) halmozódik fel. Euglikémiás körülmények között ezeknek az útvonalaknak az aktivitása alacsony és a glükóz a sejtben glükóz-6-foszfát (glükóz-6-P) és fruktóz-6-foszfát (fruktóz-6-P) közti termékeken keresztül a glikolízisbe lép és a citromsavcikluson keresztül használódik fel. (Davidson és mtsai, módosított ábra)<sup>11</sup>

Az AGE-k származhatnak közvetlenül, nem enzimátikus glikáción keresztül vagy közvetve, dikarbonil metabolitok keletkezése útján. Az AGE-k olyan jelátviteli folyamatokat indítanak be (nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B), nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz aktiváció), melyek szuperoxid képződésen keresztül hozzájárulnak a glükotoxicitáshoz, ill. következményesen károsíthatják a glikálódott fehérjék struktúráját és funkcióját<sup>12</sup>. A vese glomeruláris bazálmembránjában az AGE-kereszt kötések a permeabilitás fokozódásához vezethetnek<sup>13</sup>, a glikáció hatására megváltozott töltésű albumin pedig könnyebben jut át a bazálmembránon.

A glükóz növeli a diacil- glicerol szintjét is, mely PKC aktivációhoz vezet. A PKC számos jelátviteli út beindításán keresztül (endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ), NAD(P) oxidáz növeli a szabadgyökök (ROS) mennyiségét <sup>14</sup>.

A poliol út két lépésből álló metabolikus útvonal, melynek során az aldóz reduktáz enzim segítségével a glükóz szorbitollá, majd fruktózzá alakul. A folyamat termékei és a megváltozott kofaktor egyensúly (NADPH és ezen keresztül redukált glutation csökkenés) fokozza a ROS termelődését és intracelluláris oxidatív stresszt idéz elő <sup>10</sup>.

Végül a legutoljára taglalt mechanizmus a hexózamin anyagcsere útvonal (hexosamine biosynthetic pathway-HBP) felerősödése, melynek során a feleslegben lévő glükóz, fruktóz-6-foszfáton, majd további metabolitokon keresztül a fehérjék specifikus oxigénhez kapcsolt  $\beta$ -N-acetilglükózaminnal történő módosulására (O-GlcNAciláció) használandó fel, mely dolgozatomban központi témáját adja. Az O-GlcNAcilált fehérjék számos jelátviteli útvonal befolyásolásán keresztül (TGF- $\alpha$  és  $\beta$ -1, plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) aktiválás, eNOS és szarkoplazmás retikulum kalcium ATP-áz-SERCA2a gátlás) járulnak hozzá a glükotoxicitáshoz, illetve valószínűsíthetően szerepet játszanak az inzulinrezisztencia kialakulásában <sup>10</sup>.

## 1.2. Diabéteszes nefropátia (DNP)

A DNP a végstádiumú veseelégtelenség leggyakoribb oka, előfordulása a cukorbetegséggel párhuzamosan folyamatosan nő. A vesekárosodás átlagosan 10-15 évvel a DM fennállása után lép fel. A veseműködés beszűkülése T1DM cukorbetegekben 30-40%, <sup>15</sup> T2DM-ben 20-30% eséllyel alakul ki <sup>16</sup>. T2DM esetében a nefropátia már a cukorbetegség diagnózisakor jelen lehet.

A DNP az albuminúria fokozódásával, a vérnyomás emelkedésével és a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) csökkenésével jár. Az albuminúria szűrését T1DM esetén a betegség fennállásától számított 5 évvel, T2DM esetén a diagnózis felállításakor

kell elvégezni. A DNP diagnózisa kimondható, amennyiben a pácienseknél 3 hónapon belül háromból minimum 2 alkalommal kóros albuminürítést vagy beszűkült vesefunkciót észlelünk, és egyéb eredetű vesebetegség, illetve orthosztatikuss vagy mars-proteinúria jelenléte kizárható. Átmeneti pozitívás előfordulhat még láz, infekció, menstruáció, hematuria, hipertónia és ACE gátlók használata esetén, ilyenkor a mérést az okok megszűnése után újból meg kell határozni <sup>9;17</sup>.

A DNP klinikai képe és a szöveti elváltozásai alapján öt stádiumot írtak le (1. táblázat):

*Az első stádiumban* a vese fokozott filtrációja és hipertrófiája figyelhető meg a GFR növekedésével. A hiperfiltráció oka a hiperglikémia miatt csökkent preglomeruláris vaszkuláris rezisztencia, aminek hatására megemelkedik a glomeruláris intrakapilláris nyomás <sup>18</sup> és károsodik a normális autoreguláció <sup>19</sup>. A magas vércukorszint ill. felszaporodott szabadgyökök miatt fokozott glikáció és lipidperoxidáció károsítja a sejteket és transzportereket, ezáltal a kompenzációs mechanizmusok sérülnek <sup>20</sup>.

*A második stádiumban* a fokozott igénybevétel miatt intermittáló mikroalbuminúria (30-300 mg/nap) jelenik meg és szövettanilag kimutathatóvá válik a glomerulusok bazálmembránjának megvastagodása és a mezangiális mátrix felszaporodása <sup>20</sup>.

A betegség *harmadik stádiumára* már a tartós mikroalbuminúria, a bazálmembrán további vastagodása és mezangiális mátrix fokozott felhalmozódása jellemző. A vérnyomás normális diurnális ritmusa eltűnik, határérték hipertónia fordulhat elő és a GFR csökkenni kezd.

*A negyedik stádiumban* az albuminvesztés tovább nő (> 300 mg/nap, makroalbuminúria), amihez proteinúria társul, nefrózis szindróma alakulhat ki. A vese-funkció beszűkülése miatt csökken a vizeletképződés, ezáltal emelkedik a szérum kreatinin szint és ezzel párhuzamosan nő a vérnyomás <sup>21</sup>.

*Az ötödik stádiumban* a glomerulusvesztés miatt csökken az albuminúra, a vese vizeletkiválasztó és hormonális funkciójának irreverzibilis beszűkülése pedig krónikus veseelégtelenséghez vezet <sup>20</sup>. A csökkent eritropoetin termelés anémiát okozhat és zavart szenved a D-vitamin vesében történő aktív formává alakulása, ami miatt csökken az intesztinális kalciumfelszívódás és fokozódik a csontvesztés. A fehérjevesztés miatt a

koleszterin és triglicerid szintek emelkednek <sup>22</sup>. A GFR 10 ml/perc alá történő beszűkülése, az urémiás tünetek (perikarditis, encephalopathia), a gyógyszeresen nem kezelhető ödéma, hiperkalémia, hipertónia, acidózis, anémia megjelenésével szükségessé válik vesepótló kezelés megkezdése <sup>23</sup>. A DNP stádiumának jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.

**1.Táblázat: A diabéteszes nefropátia stádiumai <sup>9</sup> (GFR: glomeruláris filtrációs ráta)**

Stádiumok	GFR	Albuminúria	Vérnyomás	Szövettan	Időtartam
I. Hiperfiltráció	↑	nincs	normál	vese-és glomeruláris hipertrófia	a diabétesz diagnózisakor
II. Intermittáló albuminúria	↑	intermittáló mikroalbuminuria	normál	bazálmembrán megvastagodás, mezangium expansió	5-6 év
III. Mikroalbuminúria	↑/→.	tartós mikroalbuminúria	↑	progresszió	7-15 év után
IV. Manifeszt nefropátia	↓	masszív proteinúria	↑↑	Glomerulo- és arterioszklerózis, tubulointersticiális fibrózis	15-25 év után
V. Urémia	↓↓ urémia	↓ a működő nefronok számának csökkenésével	↑↑↑	Masszív fibrózis	25-30 év után

*Patomechanizmus:*

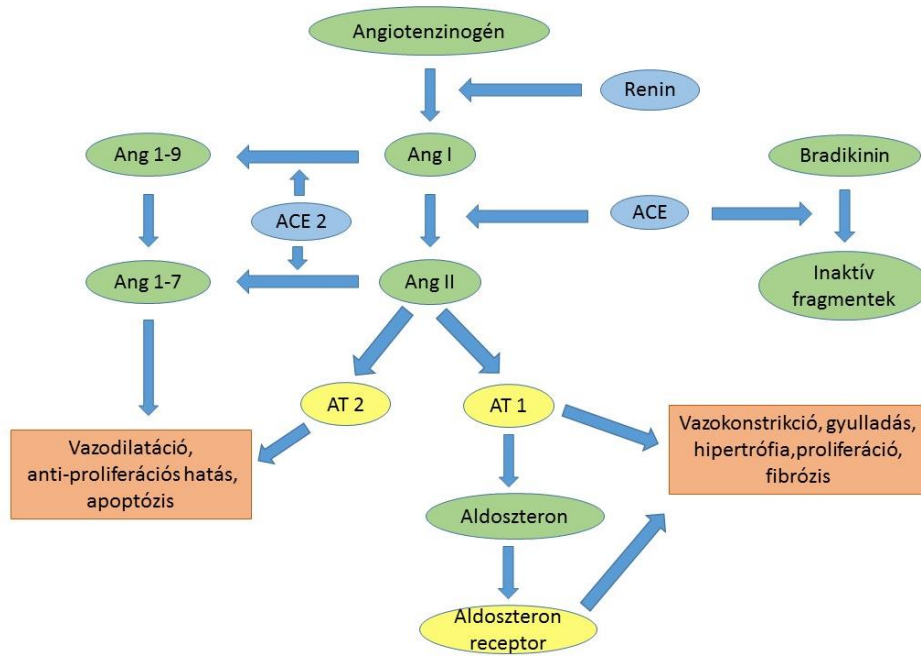
A DNP kialakulását metabolikus és hemodinamikai faktorok kölcsönhatása magyarázza. A folyamat elindításában és fenntartásában központi szerepet játszik a kontrollálatlan vagy tartós hiperglikémia, a hemodinamikai faktorok között pedig legfontosabb tényezőként a szisztémás és intraglomeruláris nyomás emelkedése, valamint a RAAS aktiválódása szerepel <sup>9</sup>.

A DNP patomechanizmusában kiemelt szerepe van a proximális tubulusok károsodásának. Mivel a proximális tubulusok glükóz felvétele inzulintól független, ezáltal képtelenek kellően csökkenteni a glükóz transzport mértékét, hogy megelőzzék az intracelluláris glükózkoncentráció túlzott növekedését, ami különösen érzékennyé teszi őket a hiperglikémiás körülményekkel szemben <sup>24</sup>. A korai szakaszban a glükózterhelés hatására fokozódik a proximális tubulusban a glükóz reabszorpció, a tubulusok

hiperpláziája és hipertrófiája következik be, mely az első stádiumban a GFR növekedéséhez vezet. A későbbiekben a hiperglikémia, albuminúria és a késői glikációs végtermékek által indukált oxidatív stressz és hipoxia hatására gyulladáshoz vezető citokinek, növekedési faktorok és extracelluláris mátrix komponensek termelődnek, melyek fibroblasztokat aktiválnak. Mindezek tubulointersticiális gyulladás és végső soron fibrózis kialakulását okozzák<sup>18; 24; 25</sup>.

### 1.2.1. Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)

DNP-ban kimutatható a RAAS fokozott aktivitása. A rendszer központi eleme az angiotenzin II (Ang II), mely két lépésben termelődik: az angiotenzinogénből a renin hatására előbb angiotenzin I (Ang I) jön létre, ami az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hatására Ang II-vé alakul. A keringő Ang II a vesében direkt érszűkítő hatásán és az aldoszteron aktiválásán keresztül segíti a nátrium reabszorpciót, ezáltal befolyásolja az extracelluláris folyadék háztartást és vérnyomást. Az ACE-nek két izoformája létezik: a vazodilatátor bradikinint is bontó ACE1, és az Ang I-ből Ang1-9-et, ill. az Ang II-ből Ang 1-7-et hasító ACE2. Az Ang 1-7 ACE-gátló és vazodilatátor hatású, így az ACE2-vel endogén inhibitoroként működve az Ang II túlaktiválódását gátolja<sup>26</sup>. Kóros esetben ez a természetes ellenreguláció nem elégséges és az egyensúly eltolódik. A RAAS fő elemeit a 4. ábra mutatja be.



#### 4. ábra: A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

(Ang: angiotenzinogén; ACE: angiotenzin konvertáló enzim; AT<sub>1</sub>: Ang II 1-es típusú receptora; AT<sub>2</sub>: Ang II 2-es típusú receptora) (Savoia és Roscioni<sup>27 28</sup> alapján módosított ábra)

A keringő RAAS mellett a vesében a lokális RAAS az előbbtől függetlenül szabályozódik<sup>29</sup>. A vese a RAAS összes elemét expresszálja. Mivel a lokálisan termelődő renin másodlagosan gátolni tudja a juxtaglomeruláris apparátusban történő renin termelődést<sup>30</sup>, a vesében a renin és az Ang II koncentrációja több százszorosa lehet a szisztémás hormonszinteknek<sup>31</sup>. A hiperglikémia már önmagában kiválthatja a lokális RAAS aktiválódását, amit az is bizonyít, hogy a proximális tubuláris sejtek 24 órán át tartó magas glükózzal történő expozíciója serkenti az angiotenzinogén mRNS expresszióját<sup>32</sup>. DM korai szakaszában a proximális tubulusban szelektíven fokozódik a renin expresszió, ami a tubuláris Ang II szint emelkedéséhez vezet<sup>33</sup>.

A túlaktiválódott Ang II hatására emelkedik a renális TGF- $\beta$  expresszió, ami károsítja az afferens arteriolák autoregulációját, így megemelkedik a glomeruláris intrakapilláris nyomás és nő a bazálmembrán fehérjeáteresztő képessége. AT<sub>1</sub>-receptorán keresztül növeli a vaszkuláris rezisztenciát, csökkenti a vese vérátáramlását, serkenti az



extracelluláris mátrix expansziót, és hozzájárul az epiteliális sejtek hipertrófiájához, melyek mind a tubulointersticiális fibrózis és glomeruloszklerózis kialakulását triggerelik.

Az Ang II és hiperglikémia továbbá serkenti az aldoszteron termelődését, ami fokozza az Ang II káros hatásait<sup>34</sup>. DM-ben normális plazma aldoszteron szintek mellett is emelkedett a renális aldoszteron mennyisége, ami önmagában is lokális gyulladást, mezangiális mátrix expansziót és fibrózist indukál, és fokozza az albuminúriát<sup>35</sup>. Emellett hozzájárul a kollagén termelődés és endoteliális diszfunkció kialakulásához<sup>36</sup>, tovább rontva a DNP progresszióját.

Végeredményben a túlaktiválódott RAAS, a hiperglikémia és a megemelkedett oxidatív stressz egymás hatását fokozva, az inzulin-rezisztencia, magas vérnyomás és érlemeszesedés kialakulásán keresztül ördögi kört hoz létre, mely megváltoztatja a vese hemodinamikai és anyagcsere-folyamatait és végső soron súlyos funkcionális és strukturális károsodásához vezet.

### 1.2.2. A Na/ K ATP-áz szerepe (NKA)

A nátrium/kálium adenzin-trifoszfátáz (NKA) fontos eleme a folyadék- és az ionháztartás szabályozásának, a  $\text{Na}^+$ -gradiens fenntartásával biztosítja a reabszorpciós folyamatok energetikai hátterét. A vesében a proximális tubulusban, a renális víz- és sóháztartás szabályozásának fő helyén fejeződik ki a legnagyobb mértékben, ahol a filtrált  $\text{Na}^+$  legnagyobb része visszaszívódik<sup>37</sup>.

Számos transzporter esetében kimutatták, hogy a hiperglikémia közvetlenül károsítja az enzimek funkcióját<sup>38</sup>. DM-ben a megnövekedett Ang II koncentráció, a  $\text{Na}^+$  reabszorpció fokozásával lényegi szerepet játszik a NKA működésében. Ismert, hogy míg alacsony koncentrációban az Ang II fokozza, addig magas koncentrációban gátolja a NKA aktivitását<sup>39</sup>.

Korábbiakban kimutattuk, hogy streptozotocin (STZ) indukálta T1DM patkánymodellben megemelkedik a renális NKA expressziója, ugyanakkor az enzim áthelyeződik a bazálmembránból a citoplazma felé, ezáltal funkcióját veszti. Nagy dózisú, szisztémás Ang II infúzió alkalmazása tovább fokozta ezeket az elváltozásokat<sup>40</sup>. A citoplazmába helyeződésnek egyik feltételezett mechanizmusa lehet, hogy a hiperglikémia hatására keletkező késői glikációs végtermékek az arachidonsav- és

foszfoinozitol metabolizmuson keresztül serkentik a NKA klattrin-mediált endocitózist<sup>41</sup>.

### 1.2.3. Akt-endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) rendszer

Az elmúlt évtizedekben egyértelművé vált, hogy az elégtelenné váló eNOS működése hozzájárul a DNP kialakulásához és progressziójához, jóllehet szerepét eddig elsősorban a vese vaszkuláris endotéliumában tanulmányozták. Az eNOS a glomeruláris endotél sejtek mellett megtalálható a proximális tubulusokban, a gyűjtőcsatornáknak, valamint a Henle-kacs felszálló vastag szegmentumában is<sup>42</sup>. Aktivációjához kulcsfontosságú a szerin1177-en történő foszforilációja, melynek fő katalizátora a foszforilált Akt (pAkt)<sup>43</sup>, mely számos jelátviteli útvonal központi molekulája<sup>44</sup>.

A eNOS hatására termelődő nitrogén-oxid (NO) növeli a renális perfúziót, gátolja a renin elválasztást, ezáltal csökkenti a vérnyomást, a nátrium- és vizelet kiválasztást<sup>45</sup>. Emellett részt vesz a trombocita aggregáció, a leukocita adhézió, angio-és atherogenezis és az ér simaizomsejt proliferációjának szabályozásában is<sup>46</sup>.

A DM-ben kialakuló mikrovaszkuláris szövődmények és endoteliális diszfunkció létrejöttében kulcsszerepet játszik a tartós hiperglikémia és a vele járó metabolikus változások. Ismert, hogy a vércukorszint emelkedés az eNOS funkciójának csökkentésén keresztül mérsékli az endotél-függő vazodilatációt<sup>47</sup>. Az AGE képződés, PKC, poliol és TGF- $\beta$  útvonalak aktiválódása, ill. a ROS képződés mind az eNOS aktivitásának csökkenéséhez vezetnek, a csökkent NO képződés pedig az oxidatív stressz súlyosbításán keresztül, tovább növeli az endotélsejt gyulladást<sup>48; 49</sup>.

### 1.2.4. Hősokkfehérjék (HSPk)

A stressz-válaszok egyik fő mediátora a hősokkfehérje (HSP)72, mely a sejtet ért károsító hatást követően termelődik<sup>50</sup>. Korábbi vizsgálatok alapján ismert, hogy azok a szövetek, melyek nagyobb mértékben expresszálják a HSP72-t, ellenállóbbak a sejteket érő stresszel szemben<sup>51</sup>. A vesében a hiperglikémia és az emelkedett glomeruláris

kapilláris nyomás celluláris stresszt idéz elő, mely serkenti a HSP72 termelődését <sup>52</sup>, a magas koncentrációjú Ang II pedig tovább növeli a HSP72 expresszióját <sup>31; 53</sup>.

A HSP72 részt vesz a a tubuláris károsodás kivédésében és a veseparenchima regenerációjában is <sup>54</sup>. Protektív szerepét mutatja, hogy a renális tubulointersticiális fibrózis modelljében (unilaterális uréter obstrukcióban), a HSP72 a tubulussejt apoptózis, intersticiális fibroblaszt infiltráció, ill. a kollagén I lerakódás mérsékléséhez vezetett <sup>55</sup>.

Mindezek mellett a HSP72 - mint a HSP70 család tagja - szerepet játszik a részlegesen károsodott vagy hibás fehérjék átalakításában és a denaturálódott proteinek degradációjában is <sup>56</sup>. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a HSP72 stabilizálja a NKA-t fiziológias helyén, valamint részt vesz a károsodott membránfehérje működésének helyreállításában <sup>57</sup>.

A celluláris sejtválasz során számos metabolikus és jelátviteli útvonal aktiválódik, melynek központi molekulája a HSP72. Ismert, hogy a kétirányú kapcsolat áll fent a HSP72 és az NO rendszer között. A HSP72 az eNOS expresszió növelésén keresztül javítja a vaszkuláris endotheliális funkciót <sup>58</sup>. A termelődő NO-nak pedig direkt indukáló hatása van a hősokkfaktor-mediált HSP72 kifejeződésére <sup>59</sup>. Ezen kívül stresszválasz hatására megemelkedő fehérje O-GlcNAciláció is növeli a HSP72 expresszióját <sup>60</sup>.

### 1.2.5. A DNP kezelése

A DNP megelőzésében és kezelésében elsődleges feladat a megfelelő vércukorszint és vérnyomásértékek beállítása. A HbA<sub>1c</sub> céltartománya 7-7,5% körüli, a célvérnyomás 130/80 Hgmm, 1g/nap proteinúria felett 125/75 Hgmm alatti kell legyen. Ezen kívül a szénhidrátháztartás egyensúlyban tartása és az egyes tápanyag-összetevők mennyiségének és minőségének biztosítása érdekében elengedhetetlen a diétás előírások betartása. Szükséges a fehérje-és sóbevitel megszorítása: a napi fehérjebevitel mikroalbuminúra esetén 0,8 g/kg, a sóbevitel 3g/nap lehet. Tanácsos a dohányzás elhagyása is, mivel a dohányzás bizonyítottan a DNP önálló rizikótényezőjének tekinthető.

Az orális antidiabetikumokat beszűkült vesefunkció esetén körültekintően és bizonyos esetekben dózisredukcióval kell megválasztani, figyelembe véve a biguanidok laktát-acidózist okozó kockázatát, és a vesén át kiválasztódó szulfonilureák hipoglikémiát okozó hatását is. Előnyben részesítendő az inzulinterápia, annak figyelembevételével,

hogy a vesefunkció romlásával a napi inzulinigény fokozatosan csökkenhet.

Ahogy a korábbi fejezetben részletes ismertetésre került az aktiválódó RAAS központi faktora a DNP kialakulásának. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a kóros albuminúria és a vérnyomáscsökkentés elsődlegesen választandó szerei az ACE-gátlók és az ARB-k, de kitűzött vérnyomásértékek elérése érdekében súlyos esetben többszörös kombinációra is szükség lehet: így pl. diuretikumok, kalcium-csatorna blokkolók vagy béta-blokkolók alkalmazására.

Jelenleg ACEI-k és ARB-k alkalmazása jelenti a gyógyszeres terápia alapját. Az Amerikai Diabétesz Társaság (ADA) 2015-ös ajánlása szerint ACE-gátlók vagy ARB-k alkalmazása javasolt mikroalbuminúria megjelenése esetén<sup>61</sup>. A magyar ajánlások szerint az ACEI-k normotenzio esetén is javítják mind a T1DM, mind a T2DM betegek albuminürítését és a DNP progresszióját, míg az ARB-k esetében T1DM-ben egyenlőre csak makroalbuminúria esetén ajánlják<sup>9</sup>. Az ACEI-k ráadásul csökkentik a kardiovaszkuláris mortalitást diabéteszes betegekben<sup>62</sup>, míg ARB-k esetében ugyanezt a hatást nem sikerült kimutatni<sup>63</sup>. Mindkét gyógyszer alkalmazása esetén szükséges a kálium szintek szoros ellenőrzése a terápia kezdetén ill. a veseelégtelenség progressziójakor. Az ADA az aldosteron-antagonisták alkalmazását csak társuló hipertónia esetén tartják indokoltnak<sup>6</sup>.

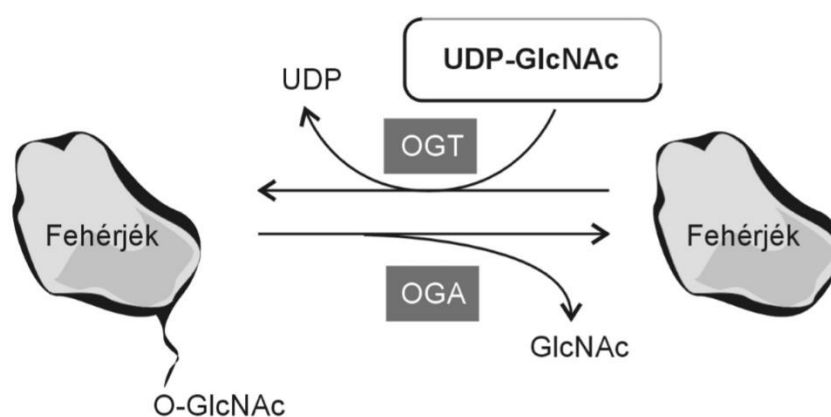
A RAAS-gátlók kombinációs kezelése, így az ACEI-k és ARB-k aldosteron-antagonistákkal vagy direkt renin-inhibitorokkal történő együttes adása is felerősült a fokozott albuminúria csökkentő hatás miatt<sup>64</sup>. Azonban a kombinációs kezelések nem bizonyultak hatékonyabbnak a monoterápiához képest a veseprogresszió és kardiovaszkuláris mortalitás szempontjából, viszont megnövelték a káros mellékhatások, így pl. a hiperkalémia előfordulását<sup>63</sup>.

A vesebetegség progressziójával további kiegészítő gyógyszerekre van szükség a zsírsanyagcsere, anémia és D-vitamin hiány rendezése érdekében, azonban a jelenleg rendelkezésre álló terápia ellenére a betegek jelentős hányadánál kialakul a végstádumú veseelégtelenség, és vesepótló kezelés válik szükségessé.

### 1.3. A fehérjék O-GlcNAc-ációs módosulása

Az O-GlcNAc-áció az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosulás, mely fontos szerepet játszik a sejtek szabályzó folyamataiban. A folyamat során a glükóz a hexózamin útvonal lépésein keresztül átalakulva a fehérjék szerin és treonin hidroxilcsoportjaihoz kapcsolódik, mely a klasszikus glikációval ellentétben enzimatikusan szabályozott. *In vitro* sejt kultúrán végzett tanulmányok alapján a sejtekbe felvett glükóz 2 - 5%-a halad át a HBP-n. Az anyagcsereút fő szabályozója a glutamin: fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz (GFAT), mely az útvonal első, sebesség-meghatározó lépését katalizálja, ezáltal meghatározza a belépő glükóz mennyiségét. A GFAT enzimaktivitását számos faktor befolyásolja: a glükóz és az inzulin az aktivitást növeli, míg az anyagcsereút végterméke az uridin-difoszfó-N-acetilglükózamin (UDP-GlcNAc), negatív visszacsatolásként az aktivitást csökkenti<sup>65; 66</sup>. Az UDP-GlcNAc prekursorként szerepel glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok szintézisében, ugyanakkor nélkülözhetetlen a fehérjék O-GlcNAc-ációjához<sup>67</sup>.

A reakció során egyetlen O-GlcNAc csoport helyeződik át a fehérjékre az O-GlcNAc-transzferáz (OGT) segítségével, míg az eltávolítást is egyetlen enzim, az O-GlcNAcáz (OGA) katalizálja. A két enzim dinamikus egyensúlyban tartja a glikozilációt és deglikozilációt, és finomhangolja különböző folyamatok jeláviteli útvonalait<sup>68</sup>. (5. ábra)



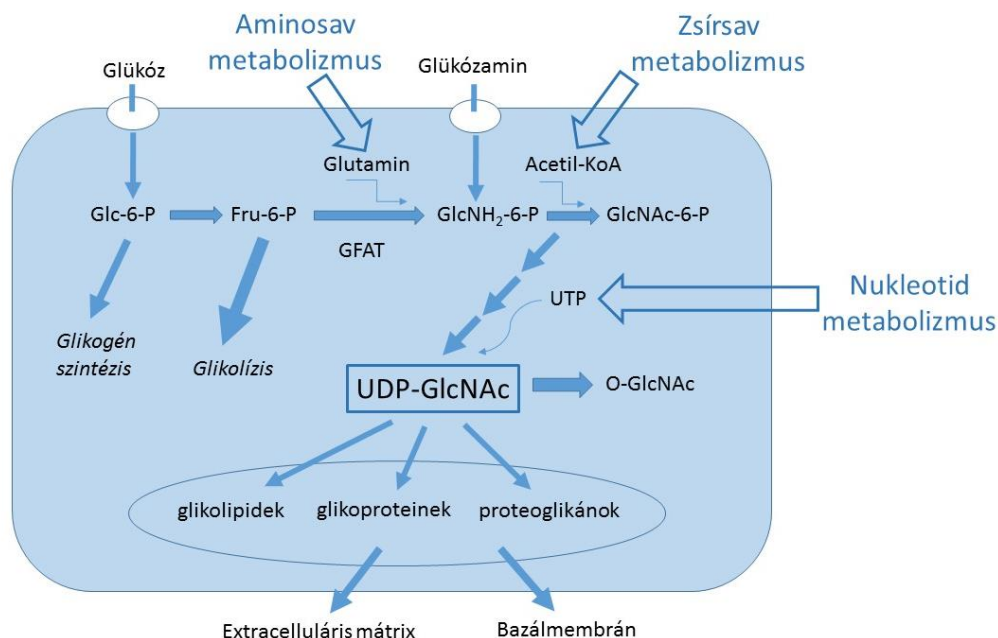
#### 5. ábra: A fehérjék O-GlcNAc-ációs módosulása

Az O-GlcNAc-áció során az O-GlcNAc-transzferáz (OGT) katalizálta reakcióban az uridin-difoszfó-N-acetilglükózamin csoportról (UDP-GlcNAc) egy oxigénhez

kapcsolt N-acetilglükózamin (O-GlcNAc) molekula kapcsolódik a fehérjékhez, aminek eltávolítását az O-GlcNAcáz (OGA) végzi. (Fülöp és mtsai ábrája alapján módosítva)<sup>69</sup>

Az O-GlcNAciláció a foszforilációhoz hasonlóan egy dinamikus és reverzibilis folyamat, mely ugyanazon oldalláncokon megy végbe, ezért számos fehérje esetében kompetícióba lép a foszforilációval. Az O-GlcNAcilált fehérjék többsége foszfoprotein is egyben, így a két módosulás közötti kölcsönhatás széleskörű, ami lehetővé teszi a fehérjék funkcióinak és jelátviteli útvonalaknak közös szabályozását<sup>70</sup>. A foszforilációval ellentétben, melynek szabályozásáért több száz kináz és foszfatáz felelős<sup>71</sup>, az O-GlcNAciláció mértékét a fenti két enzim működése határozza meg.

Az O-GlcNAciláció mértéke szorosan összefügg a HBP-n történő glükóz áramlástól. Mivel az UDP-GlcNAc szintéziséhez az összes nagyobb anyagcsere útvonal (glükóz-, aminosav-, zsírsav- és nukleotid metabolizmus) elemeire szükség van, ezért a sejt tápanyag ellátottsága hatással van a csoport intracelluláris koncentrációjára. Továbbá az OGT katalitikus aktivitása igen érzékeny az UDP-GlcNAc sejten belüli szintjére, így a HBP és O-GlcNAciláció tápanyag-szenzorként is működik<sup>72</sup>.



## 6. ábra: A hexózamin anyagcsereút

A hexózamin anyagcsereútba (hexosamine biosynthetic pathway, HBP) való belépés folyamatát és sebességét az glutamin: fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz

(GFAT) szabályozza, mely a fruktóz-6-foszfátot (Fru-/-P) alakítja glükózamin-6-foszfáttá (GlcNH<sub>2</sub>-6-P), glutamint használva amino-csoport donorként. A GlcNH<sub>2</sub>-6-P átalakulása N-acetil-glükózamin-6-foszfáton (GlcNAc-6P) és N-acetil-glükózamin-1-foszfáton (GlcNAc-1P) keresztül az UDP-N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNAc) szintéziséhez vezet. (Fülöp és mtsai ábrája alapján módosítva)<sup>69; 73</sup>

Az OGT-t kódoló génből alternatív splicing-gal három különböző izoforma jön létre, nukleocitoplazmatikus (ncOGT, 110 kDa); mitokondriális (mOGT, 103 kDa) és a rövid (sOGT, 78 kDa) OGT, melyek csupán tetra-trikopeptid ismétlődő szakaszainak számában (TPR, tetratricopeptide repeats) térnek el egymástól, ezáltal eltérő szubsztrát szelektivitással rendelkeznek.

Az OGA-nak két izoformája létezik: a teljes hosszúságú, hiszton-acetiltranszferáz tulajdonsággal is rendelkező és a citoszolban lokalizálódó hosszú (OGA-L, 130kDa) és a C-terminális régió nélküli, rövid (OGA-S, 70kDa) izoforma <sup>74; 75</sup>. Az OGA-L magasabb enzimaktivitással rendelkezik, ezért főképp ez felel az O-GlcNAc-csoportok eltávolításáért a sejtben, míg az OGA-S kisebb mennyiségben található a sejtmagban és lipidcseppekhez kötve <sup>75; 76; 77</sup>.

Az O-GlcNAciláció szerepe a sejtes folyamatokban nagyon komplex. A sejteket ért celluláris stressz kiváltotta O-GlcNAc módosulás növeli a sejtek ellenálló képességét a stressz hatásokkal szemben. Ugyanakkor a tartós hiperglikémia miatt elhúzódó és felhalmozódó O-GlcNAciláció nemcsak a foszforiláció által szabályozott jelátviteli útvonalak, hanem a transzkripció és fehérjefunkció befolyásolásával is képes hosszútávú, káros változásokat létrehozni a sejtfunciókban <sup>78</sup>. Krónikus felhalmozódását számos betegséggel hozták összefüggésbe, mint például az inzulinrezisztencia és T2DM, neurodegeneratív betegségek, például az Alzheimer kór illetve a daganatok kialakulása <sup>79; 80</sup>.

### 1.3.1. O-GlcNAciláció DM-ban

Az 1980-as években történő felfedezése óta az O-GlcNAcilációval kapcsolatos kutatási eredményeknek köszönhetően egyértelművé vált, hogy az O-GlcNAciláció szerepet játszik a glükotoxicitás közvetítésében és az inzulinrezisztencia kialakulásában, mely a T2DM és a kontrollálatlan T1DM két alapköve. Cukorbetegségben a fokozott O-

GlcNAcilálódást mutatja, hogy a legtöbb szövetben, mely érintett a DM késői szövődményeinek kialakulásában, fokozott GFAT expressziót és aktivitást igazoltak, ami korrelál a HbA1c, valamint a posztprandiális glükóz szintjével <sup>81; 82</sup>.

Az O-GlcNAciláció számos helyen szerepet játszik a DM patogenezisében. Először patkány adipocitákban mutatták ki, hogy a megnövekedett HBP-n keresztüli glükózáramlás csökkent inzulinérzékenységet vált ki <sup>83</sup>. Az O-GlcNAcilálódás következtében csökken a zsírszövetben található glikogén-szintáz enzimaktivitása <sup>79</sup>, izomsejtekben pedig a GLUT-4 transzporter inzulin-indukálta kihelyeződése <sup>84</sup>, ami a hiperglikémia elhúzódsához vezet. Pankreasz-sejtekben a megnövekedett O-GlcNAciláció csökkenti az inzulinszekréciót és  $\beta$ -sejt apoptózist indukál <sup>85; 86</sup>. Hepatocitákban az OGT fokozott aktivációja csökkenti az inzulin-érzékeny gének kifejeződését és inzulinrezisztenciát ill. hiperlipidémiát hoz létre <sup>87</sup>. Kimutatták, hogy az inzulinkaszád főbb alkotóinak (Akt, inzulin receptor szubsztrát-1) O-GlcNAcilálódása összességében rontja az inzulin jelátvitelt <sup>88</sup>. Mindezek az adatok egyértelműen alátámasztják az O-GlcNAciláció központi jelentőségét a DM és a glükotoxicitás indukálta szövődmények kialakításában.

### 1.3.2. O-GlcNAciláció DNP-ben

Egyre több adat áll rendelkezésre az O-GlcNAciláció szerepéről a DNP kialakulásában és progressziójában, azonban az eredmények zöme T2DM-re vonatkozik. Kimutatták, hogy míg normál veseszövetben az O-GlcNAc csoportok termelődéséért felelős HBP kulcsenzime, a GFAT a tubuláris epithelsejtekben fejeződik ki és a glomerulussejtek lényegében nem festődnek, addig DNP-ban glomerulus epithelsejtek és mezangiumsejtek is erős festődést mutatnak, jelezve, hogy manifeszt DM-ben a vesében GFAT expresszió indukálódik <sup>82</sup>.

A patomechanizmusban kulcsfontosságú intrarenális RAAS és megnövekedett O-GlcNAciláció közötti kapcsolatra utal, hogy proximális tubulussejtekben glükóz vagy glükózamin adagolásával történt HBP aktiváció fokozza az angiotenzinogén és renin mRNS-expresszióját, ami sejthipertrófiához vezetett. A GFAT-gátló alkalmazása felfüggesztette a magas glükóz hatását, ami glükózamin adása mellett hatástalannak bizonyult <sup>32</sup>. Az aktiválás ráadásul a másik irányban is megvalósul, ugyanis mezangium



sejtekben az AngII is fokozza az O-GlcNAc-ilációt a HBP sebességmeghatározó enzimének, a GFAT-nak az aktiválásával<sup>89</sup>.

A megnövekedett O-GlcNAc-iláció számos transzkripciós faktor és profibrotikus fehérje expressziójának növelésével is hozzájárul a DNP progressziójához. Mezangiumsejtekben a magas glükóz által létrejött HBP aktiváció TGF- $\beta$ , PAI-1 és fibronectin termelés fokozódáshoz vezetett<sup>90; 91; 92</sup>. Ugyancsak mezangiumsejtekben a magas glükóz hatására O-GlcNAc-ilálódott ChREBP transzkripciós faktor növelte a fibrotikus lipid szintetizáló fehérjék expresszióját<sup>93</sup>. Az NF- $\kappa$ B O-GlcNAc-ilálódása megnövekedett tumornekrózis factor-alfa (TNF- $\alpha$ ) és vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (VCAM-1) termelődéshez vezetett, ami hozzájárul a gyulladás és fibrózis kialakulásához DNP-ban<sup>94</sup>.

Mindezek az adatok egyértelműen alátámasztják az O-GlcNAc-iláció központi jelentőségét a DM és a glükotoxicitás indukálta renális szövődmények kialakításában, azonban az eredmények zöme T2DM-re vonatkozik.

Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az O-GlcNAc-iláció milyen szerepet játszik a DNP patomechanizmusában, különös tekintettel az Akt-eNOS jelátvitelre, a hősokkválaszra és a Na-pumpa működésére. Vizsgáltuk továbbá, hogy a terápiában elsődlegesen választandó RAAS-gátlók befolyásolják-e a diabéteszes szövődmények kialakulásában és progressziójában részt vevő O-GlcNAc-iláció folyamatát és enzimeit DNP-ban.

## 2. Célkitűzések:

1. Az O-GlcNAciláció mértéke hogyan változik *in vivo* a DNP experimentális modelljében és *in vitro* proximális tubulussejt-tenyészetben magas glükóz kezelés után?
2. Miként módosulnak az O-GlcNAcilációt szabályzó OGT és OGA enzimek szintjei a modellekben?
3. Hogyan befolyásolja a hiperglikémia és a magas glükóz kezelés a foszforilált eNOS és Akt mennyiségét experimentális DNP modellben és a proximális tubulussejtekben?
4. Mi a szerepe az O-GlcNAcilációnak a NKA és a HSP72 mennyiségének és működésének változásában *in vivo* DNP-ban és *in vitro* a proximális tubulusokban?
5. A RAAS-gátlók monoterápiában alkalmazva hogyan befolyásolják az O-GlcNAciláció folyamatát és enzimjeit DNP-ban?

### 3. Módszerek

#### 3.1. *In vitro* kísérletek

Kísérletünkben immortalizált human kidney 2 (HK2) proximális tubulussejteket (Gibco, Life Technologies Corporation, Budapest, Magyarország) tenyésztettünk magas glükóz tartalmú (35mM) Dulbecco's Modified Eagle Médiumban (DMEM), melyhez 10% magzati borjú szérumot (FBS, Gibco, Life Technologies Corporation, Budapest, Magyarország), 1% glutamint és 1% antibiotikum-antimikotikum keveréket adtunk (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország).

A sejteket vízzel telített 95% levegő és 5% CO<sub>2</sub> keverékében, 37°C-on inkubáltuk majd 24 órára szérum-mentes médiumban 6-well plate-re helyeztük ( $5 \times 10^5$  sejt/well). Ezután a sejteket kontroll (5mM) és magas glükóz (35 mM) tartalmú tápfolyadékban tartottuk 24, illetve 48 órán keresztül. A magas glükózon tartott sejteket Enalaprillal (HG+Enalapril; 1 $\mu$ M), Lozartánnal (HG+Lozartán; 10 $\mu$ M) és Eplerenonnal (HG+Eplerenon; 10 $\mu$ M) kezeltük. Ozmotikus kontrollként magas mannóz (5mM glükóz+30mM mannóz) tartalmú DMEM-ben tenyésztett sejteket használtunk.

A sejtvitalitás meghatározásához a sejteket Thiazolyl-kékkel (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid, MTT) inkubáltuk 4 órán keresztül, majd dimetil-szulfoxid (DMSO)/etanol 1:1 arányú keverékében lizáltuk. A vízdékony formazán-képződés koncentrációját az optikai denzitás mérésével határoztuk meg 570 nm hullámhosszon mérve plate Chameleon V Fluorometer-Luminometer-Photom reader-rel (Hidex, Turku, Finland).

#### 3.2. 1-es típusú diabétesz (T1DM) patkánymodell

Kísérleteinket 6 hetes, 180-200 gramm súlyú, ivarérett, hím Wistar patkányokon (Toxi-Coop Kft., Dunakeszi, Magyarország) végeztük. Az állatokat állandó (21°C) hőmérsékleten, 75% páratartalom és 12 óránként változó megvilágítás mellett tartottuk, állandóan elérhető standard rágcsálótápot és friss csapvizet biztosítottunk.

Kísérleteinket a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelvei alapján a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottság etikai engedélyével végeztük.

T1DM-et egyszeri, citrátban (0,1 M; pH=4,5) oldott 65 mg/ttkg dózisé, intraperitoneális injekcióban adott STZ-vel (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) indukáltunk. 72 órával az injekciót követően az állatok éhhomei vércukor értékét farokvénából vett vérből Dcont Trend vércukormérő készülékkel (77 Elektronika Kft, Budapest, Magyarország) ellenőriztük. A cukorbetegség alsó határértékeként a 15 mmol/l feletti vércukorértéket fogadtuk el, az ennél alacsonyabb vércukor értékkel rendelkező állatokat kizártuk a vizsgálatból.

5 héttel a T1DM fennállását követően az állatokat négy csoportba osztottuk (n=8/csoport) és 2 hétig *per os* kezeltük izotóniás sóoldatban oldott:

1. enalaprillal (40mg/ttkg/nap)
2. lozartánnal (20mg/ttkg/nap)
3. non-szelektív aldoszteron antagonistá spironolaktonnal (50mg/ttkg/nap) és szelektív aldoszteron antagonistá eplerenonnal (50mg/ttkg/nap)
4. illetve vehikulumként izotóniás sóoldattal.
5. Kontrollként kezeletlen, korban és testtömegben illesztett állatok szolgáltak.

Az eplerenont jelenleg csak szívelégtelenség kezelésére alkalmazzák, azonban, mivel korábbi eredményeink alapján a szelektív aldoszteron antagonistá eplerenon éppolyan hatékonynak bizonyult a DNP progresziójának javításában, mint a non-szelektív, így több mellékhatással rendelkező spironolakton, ezért jelen kísérletünk célja annak bizonyítása, hogy az eplerenonnak is helye van a DNP terápiájában <sup>95</sup>.

A gyógyszerek dózisé vizsgálateink alapján úgy választottuk meg, hogy az állatok vérnyomását ne befolyásolják, de ACE, AT1 és aldoszteron receptor blokkoló hatásukat kifejtsék <sup>95</sup>.

A 2 hetes kezelés elteltével az állatokat *ip.* Ketamin-Xylazin (Calypsol 50mg/ml oldatos injekció, Richter Gedeon, Hungary, CP-Xylazin 2%-os injekció, Medicus Partner Kft, Hungary) 8:2 arányú keverékével elaltattuk, hólyagpunkcióval vizeletmintát vettünk, a veséket eltávolítottuk. A vér egy részét vérképvizsgálatra etilén-diamin-tetraecetsavas (EDTA) vércsőbe raktuk, másik részéből szérumot izoláltunk. Az eltávolított veséket

további vizsgálatokig 4%-os pufferolt formalinban (pH=7,4) szobahőn vagy szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80°C-on tároltuk.

### 3.2.1. Vérnyomásmérés-és pulzusmérés

Az állatok artériás vérnyomását és pulzusát a 2 hetes RAAS gátló kezelés és a leölés előtt a CODA Standard Tail-cuff monitoring rendszerrel (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) végeztük. Az állatokat isoflurán anesztéziában (3% izoflurán, levegővel elegyítve) izoflurán vaporizátort használva (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, UK) altattuk. Minden állatnál legalább három mérést végeztünk.

### 3.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok

Az állatok leölésekor vett vérből szérumot izoláltunk, melyben fotometriás módszerrel Hitachi-712 automatizált spektrofotométeren (Roche Hitachi, Basel, Svájc) meghatároztuk a szérum glükóz, fruktózamin, kreatinin, karbamind, koleszterin, HDL és triglicerid paramétereit. A gyűjtött vizeletből kreatinin mennyiségi meghatározást végeztük el. A kreatinin clearance értékét a következő képlettel becsültük:  $(\text{vizelet kreatinin} \times \text{vizeletmennyiség} / \text{szérum kreatinin}) / \text{vizeletgyűjtési idő percenként} / \text{állat súlya} \times 100$ .

### 3.2.3. Vesék szövettani vizsgálata

A hisztológiai vizsgálatokhoz a veséket 10 %-os paraformaldehidben fixáltuk, parafinba ágyasztuk, majd az 5 µm-es metszeteken hematoxillin-eozin, perjódsvav Shiff (PAS) és Masson trichrome festést alkalmaztunk. A glomeruláris mátrix expansió és tubulointersticiális fibrózis meghatározásához minden metszetről 10, random kiválasztott glomerulust ill. glomerulus nélküli területet választottunk ki Panoramic Viewer Program segítségével (3DHISTECH Ltd., Budapest, Magyarország). A 200 x-os nagyítású metszeteken kiszámoltuk a püspöklilán festődő mezangiális mátrix ill. kéken festődő

fibrotikus szövet teljes szövethez viszonyított arányát *Adobe Photoshop* és *Scion Image* szoftverek segítségével.

### 3.3. Western blot analízis

A fehérje mennyiségi meghatározásához a veseszövetet hűtött lízis pufferben [(pH 7.4) 100 mM tris(hidroximetil)aminometán (TRIS), 1 mM etilén-glikoltetraecetsav (EGTA), 1% Triton X-100, proteáz és foszfatáz inhibitorok: 0,01 mg/ml approtinin, leupeptin, 1mM fenilmetánszulfonil fluorid (PMSF), 1mM nátrium orthovanadát ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )] Fastprep RP120 homogenizátorral homogenizáltuk. Az O-GlcNAc-izáció vizsgálatához elkülönített fehérjék lízis pufferét kiegészítettük OGA-gátlóval (O-(2-acetamido-2-deoxi-D-glukopiranozilidén)-amino-N-fenilkarbamát) (PUGNAC), hogy elkerüljük az o-glikozil csoportok gyors bomlását a szövetben. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (10 perc, 13 000 rpm, 4°C), majd a felülúszóból Bio Rad Protein Assay Kit-tel (Bio-Rad, Budapest, Magyarország) fehérjekoncentrációt határoztunk meg. A fehérjéket SDS-poliakrilamid géleken megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk (Bio-Rad, Budapest, Magyarország). A minták mellett párhuzamosan molekulásúly-markert (Precision Plus Protein Standard Dual Color, Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország) futtattunk.

A blottolás után a membránt 1% Ponceau S (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország), 25 % ecetsav (Reanal Kft, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékkel megfestettük majd 1 órán keresztül blokkoltuk szobahőmérsékleten 1% TBS és 5% zsírmentes tejpor vagy 3% BSA tartalmú blokkoló folyadékban az antitesttől függően. Ezt követően a membránokat az elsődleges antitesttel inkubáltuk: anti-O-GlcNAc (1:2000, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország), anti-OGT (1:1000, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország), anti-OGA (MGEA-5, 1:1000, Proteintech, Budapest, Magyarország), Akt (1:1000, Cell Signaling Technology, Budapest, Magyarország), pAkt (1:1000, Cell Signaling Technology, Budapest, Magyarország), eNOS (1:1000, Abcam, Cambridge, UK), peNOS (1:1000, Cell Signaling Technology, Budapest, Magyarország), HSP72 (1:9000, Dr. L. László, Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország). és NKA (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Budapest, Magyarország). A membránok mosása után a megfelelő másodlagos, tormaperoxidázzal jelölt

antitestekkel: *goat anti-mouse* (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Budapest, Magyarország), *goat anti-rabbit* (1:2000, 1:3000, 1:5000 and 1:6000 respectively, Cell Signaling Technology, Budapest, Magyarország) inkubáltuk a membránt. A feleslegben kötött ellenanyagot további mosásokkal távolítottuk el.

A membránokat kemilumineszcens technikával hívtuk elő (ECL; GE Healthcare Life Sciences, Budapest, Magyarország) és *Quantity One* szofter segítségével, denzitometriával értékeltük ki (Versadoc, Quantity One Analysis software; Bio-Rad, Budapest, Magyarország). Az értékeket integrált optikai sűrűségként (integrated optical density, IOD) a háttér kivonása után kaptuk meg. Az IOD-t Ponceau festésre és belső kontrollra normalizáltuk, hogy korigáljuk a fehérje felvitelből és a futtatásból adódó különbségeket. Az eredményeket kontroll-százalékban tüntettük fel.

### 3.4. Immunfluoreszcens festés

A fagyasztott vesemetszeteket Shandon cryomatrixba ágyasztuk (Life Science Ltd., Budapest, Magyarország) majd cryostattal 5  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk. A kiolvasztott metszeteket 60 percig inkubáltuk szobahőn, nedveskamrában PBS-ben hígított (1:500) HSP72 ellenes és (1:100) NKA ellenes poliklonális elsődleges antitesttel (ld. western blot). Ezt követően PBS-sel mostuk, majd a másodlagos nyúl-ellenes Alexa Fluor 568 (1:100, Invitrogen, Budapest, Magyarország) antitesttel inkubáltuk és Hoechst 33342-vel (Life Technologies, Budapest, Magyarország) festettük a DNS-t. A metszeteket száradás után Vectashield Mounting Mediummal (Vector Labs., Biomarker Kft., Budapest, Hungary) fixáltuk, fedőlemezzel fedtük, majd Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézermikroszkóppal (Zeiss, Jena, Németország) elemeztük 200x és 630x-os nagyítás alatt.

A HK2 sejtek immunfluoreszcens festéséhez a sejteket sejttenyésztő kamrákban (Sarstedt Kft., Budapest, Magyarország) tenyésztettük. Ismételt mosásokat követően a sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, 0,1%-os Triton X-PBS-sel permeabilizáltuk, majd 5% BSA-PBS-ben blokkoltuk. Ezután 60 percig inkubáltuk nedveskamrában a HSP72-ellenes elsődleges antitesttel (1:200). A lépések között PBS-sel történő mosásokat alkalmaztunk, majd a sejteket másodlagos nyúl-ellenes Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Budapest, Magyarország) konjugáttal inkubáltuk és a DNS-t Hoechst 33342-vel (Life Technologies, Budapest, Magyarország) festettük. A sejteket száradás után Vectashield

Mounting Mediummal (Vector Labs., Biomarker Kft., Budapest, Hungary) fixáltuk, fedőlemezzel fedtük, majd Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézermikroszkóppal (Zeiss, Jena, Németország) elemeztük 200x és 630x-os nagyítás alatt.

### 3.5. Statisztikai kiértékelés

Az adatok kiértékelését a *GraphPad* statisztikai programmal (5.00 verzió; GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA) végeztük. Az adatokat a diagramokon és táblázatokban átlag  $\pm$  SEM-ben adtuk meg. A többszörös összehasonlításokra faktoriális variancia analízist végeztünk kiegészítve Bonferroni post-hoc teszttel. A nem-parametrikus adatokra Kruskal-Vallis tesztet használtunk. Statisztikailg szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket tekintettük.

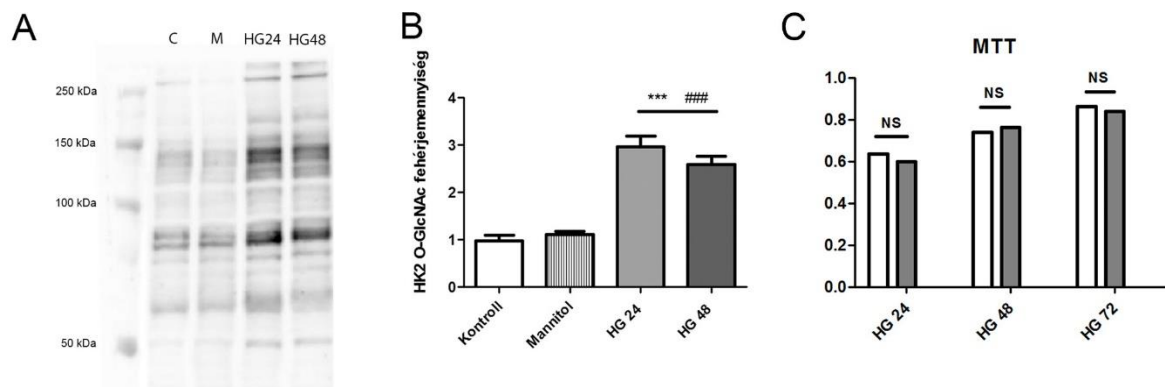


## 4. Eredmények

### *In vitro* kísérletek:

#### 4.1. Hiperglikémia indukált O-GlcNAciláció és izoforma specifikus enzim-termelődés proximális tubulussejtekben

A magas glükózon történő tenyésztés hatásait vizsgálva proximális tubulussejteken azt tapasztaltuk, hogy mind a 24, mind a 48 órás kezelés után megnőtt a fehérjék O-GlcNAcilációja, míg a kontroll és mannitol kezelt sejtek nem mutattak hasonló emelkedést (7. ábra A-B). Mindez azt mutatja, hogy a növekedés a hiperglikémia és nem a hiperozmolaritás direkt következménye.



#### 7. ábra O-GlcNAciláció és sejtvitalitás proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után

HK2 proximális tubulussejteket magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (35mM) tenyésztettük 24 (HG 24) és 48 órán (HG 48) keresztül.

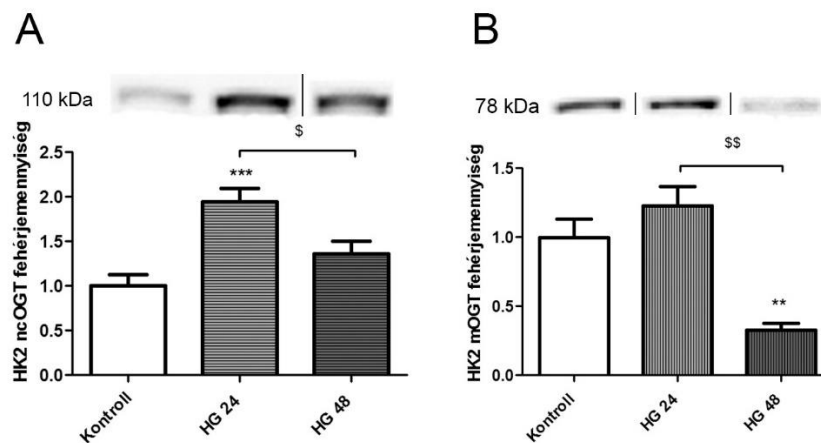
Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 12$  well/csoport, 500000 sejt/well. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontroll; ###  $p < 0,001$  vs. Mannitol.

A: Reprezentatív immunoblottok a fehérjék O-GlcNAcilációs módosulásáról.

B: A blottok denzitometriás kiértékelése a kontrollra való normalizálás után.

C: Sejtvitalitás 24 (HG 24), 48 (HG 48) és 72 órás (HG 72) magas glükóz kezelés után.

Elsőként mutattuk ki proximális tubulussejtekben a különböző szubsztrát-specifitással és intracelluláris funkciókkal rendelkező nukleocitoplazmatikus (ncOGT, 110kDa) és mitokondriális (mOGT, 103kDa) OGT izoformákat. Igazoltuk az OGT időfüggő és izoforma-specifikus változását: az ncOGT növekedett a HG24 sejtekben, majd HG48 sejtekben normalizálódott. Az mOGT nem változott a HG24 sejtekben, azonban HG48 sejtekben lecsökkent fehérjemennyiség a kontrollhoz képest (8. ábra A-B).



### 8. ábra Az OGT izoformák fehérjemennyisége proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után

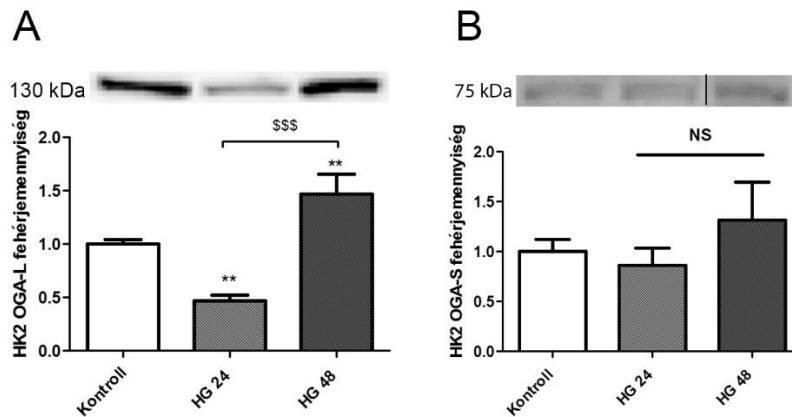
HK2 proximális tubulussejteket magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (35mM) tenyésztettük 24 (HG 24) és 48 órán (HG 48) keresztül.

Reprezentatív immunoblottok a nukleocitoplazmatikus (A: ncOGT, 110 kDa) és a mitokondriális OGT-ről (B: mOGT, 103 kDa). A grafikonok az A: ncOGT és B: mOGT relatív fehérje mennyiségét ábrázolják a kontroll, HG24 és HG48 sejtekben.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 12$  well/csoport, 500000 sejt/well. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontroll; \$ $p < 0,05$ , \$\$ $p < 0,01$  vs. HG24.

Hasonlóan az OGT-hez, a két különböző OGA izoforma is különbözően változott az időben. A hosszú izoforma (OGA-L, 130kDa), mely túlnyomórészt a citoplazmában található <sup>74</sup>, a kontroll szintje alá csökkent a HG24 sejtekben, míg megnövekedett a HG48 sejtekben - egy, a megnövekedett O-GlcNAc-iláció elleni kompenzációs mechanizmust sugallva. Magasabb enzimaktivitásának és citoplazmatikus lokalizációjának köszönhetően ez az izoforma felelős elsősorban az o-glikozil-csoport eltávolításáért <sup>77</sup>. A

rövid izoforma (OGA-S, 75kDa) sokkal kisebb mennyiségben volt jelen a sejtben, és nem mutatott különbséget a csoportok között (9. ábra A-B).



### 9. ábra Az OGA izoformák fehérjemennyisége proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után

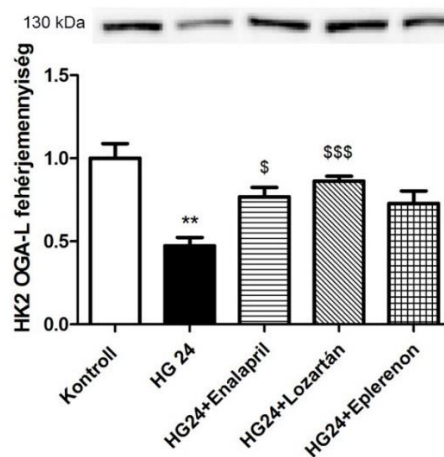
HK2 proximális tubulussejteket magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (35mM) tenyésztettük 24 (HG 24) és 48 órán (HG 48) keresztül.

Reprezentatív immunoblottok a hosszú (A: L-OGA, 130 kDa) és a rövid (B: OGA-S, 75 kDa) OGA izoformáról.

A grafikonok az A: OGA-L és B: OGA-S relatív fehérje mennyiségét ábrázolják a kontroll, HG24 és HG48 sejtekben.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 12$  well/csoport, 500000 sejt/well. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontroll; \$\$\$  $p < 0,001$  vs. HG24. NS: nem szignifikáns.

A RAAS-gátlók egyik időpontban sem befolyásolták a hiperglikémia-indukált fehérje O-GlcNAcylációt és OGT kifejeződést a proximális tubulussejtekben (adatot nem ábrázoltuk). Az OGA-S sem változott, viszont az OGA-L növekedett 24 órás Enalapril és Lozartán kezelés után.



### **10. ábra RAAS- gátló kezelés hatása az OGA-L izoforma fehérjemennyiségére proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után**

HK2 proximális tubulussejteket magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (35mM) tenyésztettük 24 órán (HG 24) keresztül. A magas glükózon tartott sejteket Enalaprillal (HG24+Enalapril; 1 $\mu$ M), Lozartánnal (HG24+Lozartán; 10 $\mu$ M) és Eplerenonnal (HG24+Eplerenon; 10 $\mu$ M) kezeltük.

A grafikon az OGA-L relatív fehérje mennyiségét ábrázolja a kontroll és a RAAS-gátló kezelt sejtekben.

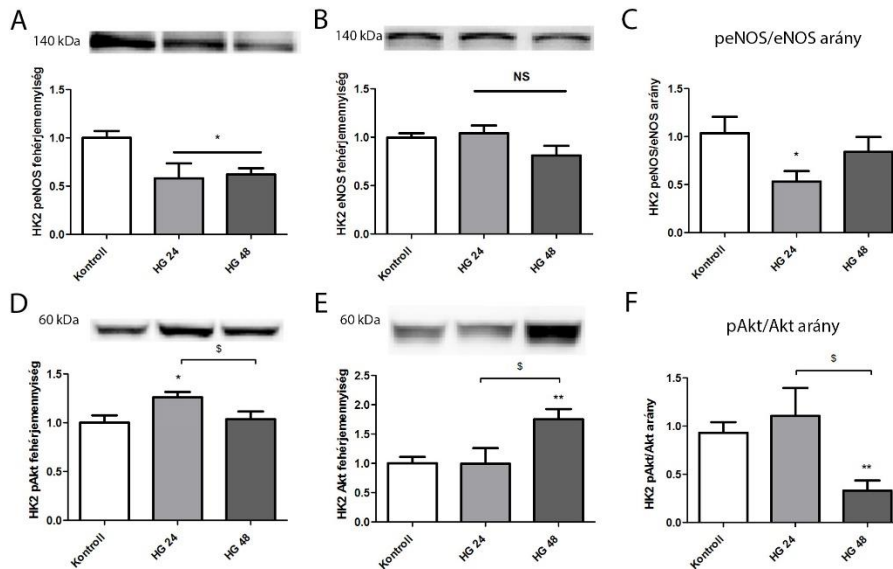
Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk; n = 12 well/csoport, 500000 sejt/well.

\*\*p < 0,01 vs. Kontroll; <sup>§</sup>p < 0,05; <sup>\$\$\$</sup>p < 0,001 vs. HG24.

### **4.2. A peNOS fehérjemennyiség változása hiperglikémia hatására proximális tubulussejtekben**

Az eNOS Ser(1177)-n történő foszforilációját pAkt katalizálja, mely kulcsfontosságú az enzim aktivációjában <sup>43</sup>. Magas glükózon tartott proximális tubulussejtekben változatlan eNOS fehérjemennyiség mellett a foszforilált eNOS mennyisége lecsökkent, ami azt sugallja, hogy az enzim foszforilálása károsodott hiperglikémiás körülmények között (10. ábra A-C).

A pAkt fehérjemennyisége megnőtt HG24 sejtekben változatlan Akt szint mellett. Az ennek ellenére alacsony peNOS szint azonban azt jelzi, hogy a megemelkedett pAkt nem aktív, vagy katalizáló funkcióját nem tudta betölteni. HG48 sejtekben a pAkt mennyisége visszaállt a kontroll szintjére, az Akt pedig megemelkedett (11. ábra D-F).



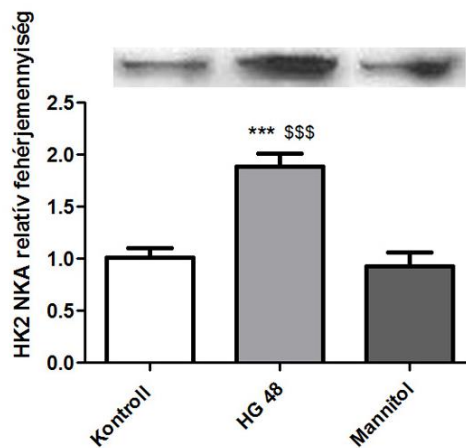
### 11. ábra Foszforilált és totál eNOS és Akt szintek proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után

Reprezentatív immunoblottok a foszforilált eNOS (Ser1177) (A: peNOS; 140 kDa), eNOS (B: 140 kDa), foszforilált Akt (Ser473) (D: pAkt; 60 kDa) és Akt (E: 60 kDa) fehérjékről.

A grafikonok az A: peNOS, B: eNOS relatív fehérje mennyiségét, C: peNOS/eNOS arányt, D: pAkt, E: Akt relatív fehérje mennyiségét és F: pAkt/Akt arányt ábrázolják a kontroll, HG24 and HG48 sejtekben.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 12$  well/csoport, 500 000 sejt/well. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs. Kontroll; §  $p < 0,05$  vs. HG24. NS: nem szignifikáns.

4.3. A NKA fehérjemennyiség változása proximális tubulussejtekben A magas glükózon tenyésztett HK2 sejtekben a NKA mennyisége kezdetben nem változott, majd megnőtt HG 48 sejtekben a kontrollokhoz képest. Az ozmotikus kontrollként használt, mannitollal tenyésztett sejtekben egyik időponban sem változott a fehérje mennyisége.



## 12. ábra. A nátrium/kálium ATPáz (NKA) fehérjemennyisége proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után

HK2 proximális tubulussejteket tenyésztettünk magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (35 mM) 48 órán (HG48) keresztül. Kontrollként mannitol (35mM) kezelt sejtek szolgáltak.

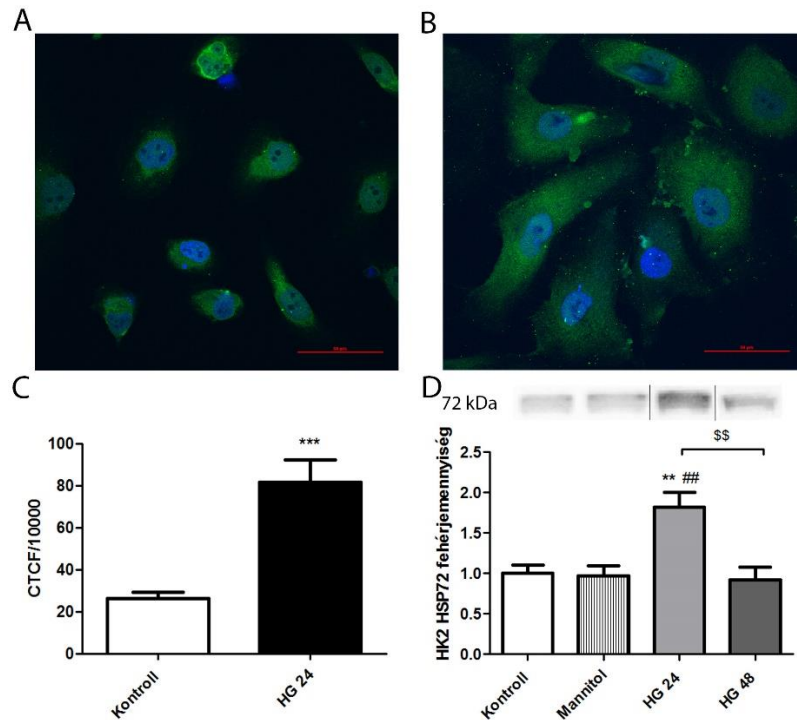
Felső kép: reprezentatív immunoblottok a NKA szintekről. A grafikonok a NKA relatív fehérjemennyiségét ábrázolják a kontroll, mannitol kezelt és HG48 sejtekben.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk, \*\*\* $p$ <0,001 vs. Kontroll; \$\$\$ $p$ <0,001 vs. Mannóz.

## 4.4. A HSP72 lokalizáció és fehérjemennyiség változása magas glükóz hatására proximális tubulussejtekben

A fehérje lokalizációjának meghatározásához immunfluoreszcens festékekkel jelzett proximális tubulussejteket vizsgáltunk, és azt tapasztaltuk, hogy míg a HSP72 a kontroll sejtekben feltűnő perinukleáris festődést mutatott, addig magas glükóz kezelés után az egész citoplazmában kimutatható volt (13. ábra A-C).

HG24 sejtekben a HSP72 mennyiségének növekedését figyeltük meg, ami azonban 48 órás kezelés után visszaállt a kontroll szintjére. Az ozmotikus kontrollként használt mannitol kezelés nem befolyásolta az enzim mennyiségét (13. ábra D).



### 13. ábra. A HSP72 lokalizációja és fehérjemennyisége proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés után

HK2 proximális tubulussejteket tenyésztettünk magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (35 mM) 24 (HG24) és 48 órán (HG48) keresztül. Kontrollként mannitol (35mM) kezelt sejtek szolgáltak.

HK2 sejtek immunfluoreszcens festett reprezentatív képei hő sokkfehérje 72-re (HSP72, zöld) kontroll (A) és HG24 (B) sejtekben (630x nagyítás, lépték: 50  $\mu$ m). A sejtmagok Hoechst 33342-vel kézzel festődnek. C: A grafikonok a Kontroll és HG24 sejtek korrigált totál sejt fluoreszcenciáját (corrected total cell fluorescence-CTCF) ábrázolják. D: Felső kép: reprezentatív immunoblottok a HSP72 szintekről. A grafikonok a HSP72 relatív fehérjemennyiségét ábrázolják a kontroll, mannitol kezelt, HG24 és HG48 sejtekben.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk, \*\*  $p < 0,01$  vs. Kontroll; ##  $p < 0,01$  vs. Mannitol; §§  $p < 0,01$  vs. HG24.

## *In vivo* vizsgálatok

### 4.5. DNP kialakulása T1DM állatokban

7 héttel az STZ-indukált diabétesz kialakulása után a patkányokban emelkedett a szérum kreatinin és karbamid szintje, míg a GFR csökkent.

A kezelések javították a renális paramétereket, igazolva korábbi eredményeinket a RAAS-gátlók, különös tekintettel az aldosteron-antagonista Eplerenon monoterápiás hatékonyságát illetően <sup>95</sup>. A használt koncentrációkban a gyógyszerek a vérnyomás csökkentésétől függetlenül fejtették ki renoprotektív hatásaikat. A vérnyomás nem változott egyik csoportban sem, mely egyrészt igazolja a RAAS-gátlók helyesen megválasztott non-presszor dózisait, másrészt a nem kezelt STZ-diabéteszes állatoknál mutatja a Wistar törzs jellegzetességét. Ebben a modellben ugyanis nem alakul ki hipertónia és kompenzatorikus tachikardia <sup>96</sup>, feltehetően a DM következtében létrejövő vesekárosodást felülíró neuropátia miatt, mely a vese mind szimpatikus, mind paraszimpatikus beidegzését károsítja <sup>97;98</sup>.

A metabolikus változások eredményeként a testsúly csökkenése, a fruktózamin és lipidszintek emelkedése következett be. A RAAS-gátlók nem befolyásolták a metabolikus paramétereket a Lozartán kivételével, mely csökkentette a szérum koleszterin szintet. A vérnyomás, a renális és a metabolikus paraméterek változását az 2. táblázat mutatja.

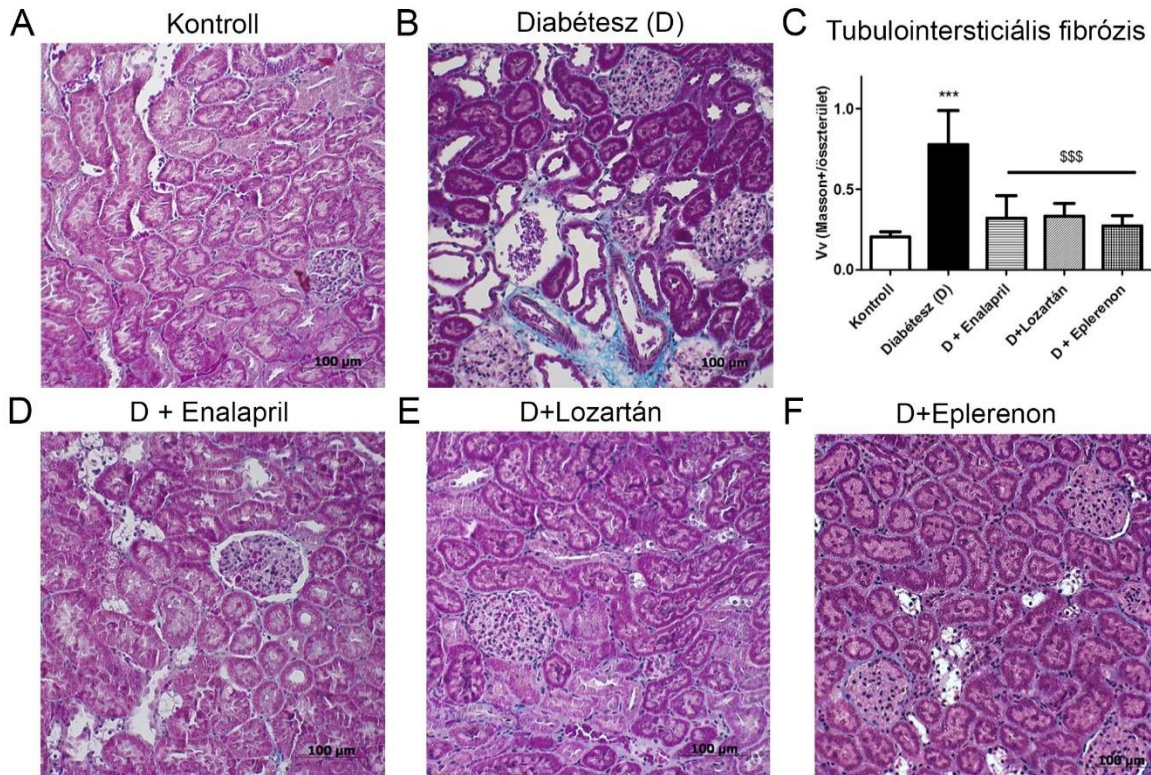
#### **2.Táblázat: Kontroll, diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok vérnyomás, metabolikus és vesefunkciós paraméterei**

A Kontroll, diabéteszes (D), illetve enalaprilal, lozartánnal és eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok vérnyomása, metabolikus és renális paraméterei átlag ± SEM-ben megjelenítve. HDL-magas denzitású lipoprotein. n = 8/csoport. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. Kontroll, §§§p<0,001 vs. Diabétesz.



Paraméterek	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Lozartán	D+Eplerenon
<b>Artériás középnyomás (Hgmm)</b>	70,0 ± 3,15	69,4 ± 5,93	66,2 ± 2,33	70,3 ± 7,65	72,3 ± 5,48
<b>Szisztolés vérnyomás (Hgmm)</b>	83,6 ± 4,18	71,9 ± 3,66	67,9 ± 2,73	69,9 ± 3,50	75,0 ± 3,69
<b>Testtömeg (g)</b>	418 ± 8,23	267 ± 11,4***	291 ± 13,3***	263 ± 12,6***	284 ± 12,5***
<b>Δ súlygyarapodás</b>	223±11,5	66,4±11,0***	90,0±15,7***	71,4±11,0***	95,5±12,1***
<b>Szérum glükóz (mmol/L)</b>	12,7 ± 0,59	47,3 ± 3,98***	35,3 ± 3,23*	43,8 ± 2,45***	34,8 ± 1,82
<b>Fruktózin (μmol/L)</b>	150±2,09	268±6,86***	250±5,09**	249±7,45*	229±6,85
<b>Szérum kreatinin (μmol/L)</b>	52,1 ± 3,90	70,5 ± 4,65*	66,3 ± 3,41	65,5 ± 2,90	62,2 ± 2,29
<b>Karbamid (mmol/L)</b>	8,75 ± 0,20	26,3 ± 2,80***	17,5 ± 2,10*	18,1 ± 1,84*	20,2 ± 0,82**
<b>Kreatinin clearance (mL/min/100g)</b>	3,28 ± 0,10	1,37 ± 0,09*	1,95 ± 0,39	1,66 ± 0,43	2,00 ± 0,24
<b>Koleszterin (mmol/L)</b>	1,69 ± 0,04	2,35 ± 0,05**	1,80 ± 0,12	1,54 ± 0,05 <sup>§§§</sup>	1,88 ± 0,08
<b>HDL-Koleszterin (mmol/L)</b>	2,21 ± 0,10	1,55 ± 0,18*	1,77 ± 0,20	1,87 ± 0,07	1,32 ± 0,08**
<b>Triglicerid (mmol/L)</b>	0,42 ± 0,03	1,90 ± 0,50**	1,49 ± 0,45*	1,31 ± 0,37	1,51 ± 0,33*

A funkcionális károsodással párhuzamosan a szövettani vizsgálatok is megerősítették a DNP kialakulását. A kezeltlen diabéteszes állatok veséi kiterjedt tubulointersticiális fibrózist mutattak a tubuláris hám ellapulásával, a kefésegyélly eltűnésével és az intersticiális tér kiszélesedésével. A RAAS-gátló kezelések csökkentették a renális strukturális károsodást a tubulointersticiális fibrózis mérséklésén keresztül (14. ábra).

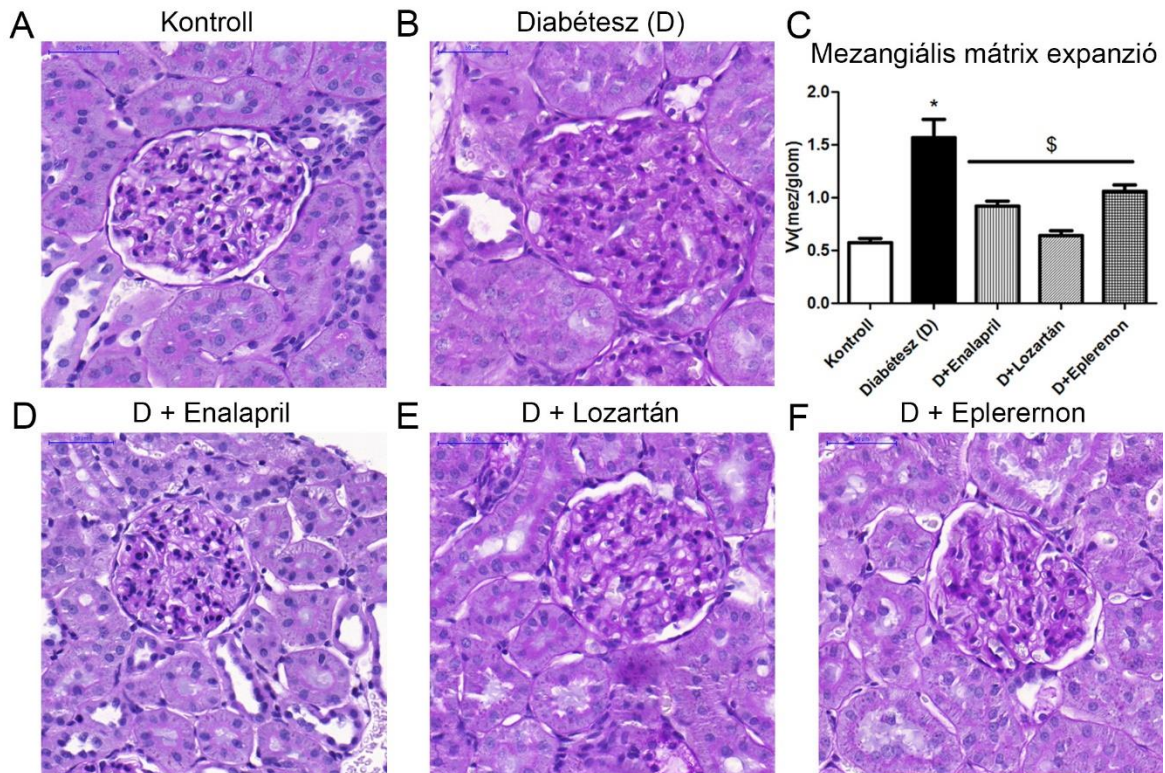


**14. ábra. Tubulointerstiális fibrózis a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátlóval kezelt diabéteszes állatok veséiben**

Kontroll (A), diabéteszes (B), Enalapril (D), Losartán (E), és Eplerenon (F) kezelt diabéteszes patkányok Masson trikróm festett vese metszetek reprezentatív képei (200x nagyítás; lépték -100 µm) of (n = 8/csoport). C: A tubulointerstiális fibrózis (Vv) mértékét a Masson festett intersticiális terület/tubulointerstiális terület arányával becsültük meg.

A fibrotikus tubulointerstiális szövetet a tubulointersticiumban lévő Masson trikróm-pozitív és glomerulus-mentes területek kiértékelésével határoztuk meg. A diabétesz-indukált tubulointerstiális fibrózis mértékét az összes RAAS-gátló javította. Az adatokat átlag ± SEM-ben ábrázoltuk. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontroll; \$\$\$ $p < 0,001$  vs. Diabétesz.

A glomeruloszklerózis jelenlétét a glomeruláris mátrix expansió mértékével határoztuk meg. Diabéteszes állatokban a glomerulusokban püspöklilán festődő mezangiális mátrix felszaporodását mutattuk ki, amit a RAAS-gátló kezelések csökkentettek (15. ábra).



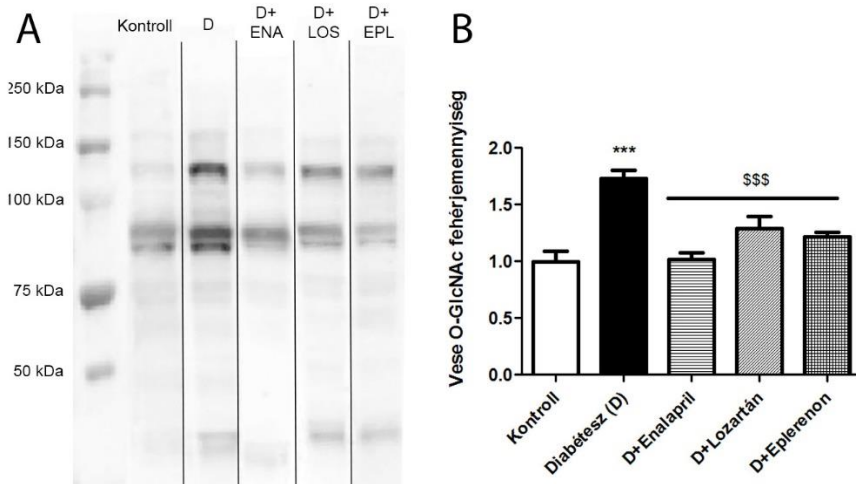
**15. ábra. Mezangiális mátrix proliferáció mértéke a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátlóval kezelt diabéteszes állatok veséiben**

Kontroll (A), diabéteszes (B), Enalapril (D), Lozartán (E), és Eplerenon (F) kezelt diabéteszes patkányok Perjódsvav-Schiff festett vese metszetek reprezentatív képei (200x nagyítás; lépték 50  $\mu$ m) of (n = 8/csoport). C: A mezangiális mátrix expanszió (Vv) mértékét a mezangiális mátrix/ glomerulus terület arányával becsültük meg. A diabétesz-indukált mezangiális mátrix expanszió mértékét az összes RAAS-gátló javította.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk. \*p < 0,05 vs. Kontroll; §p < 0,05 vs. Diabétesz.

#### 4.6. A RAAS-gátlók hatása a fehérjék O-GlcNAcilációjára valamint az enzim izoformákra diabéteszes vesében

A cukorbeteg patkányok vesekéreg állományából nyert homogenizátumokat vizsgálva, megnövekedett fehérje O-GlcNAcilációt mutattunk ki a kontrollokhoz képest. Ennek mértékét mindegyik RAAS-gátló kezelés csökkentette (16. ábra A-B).



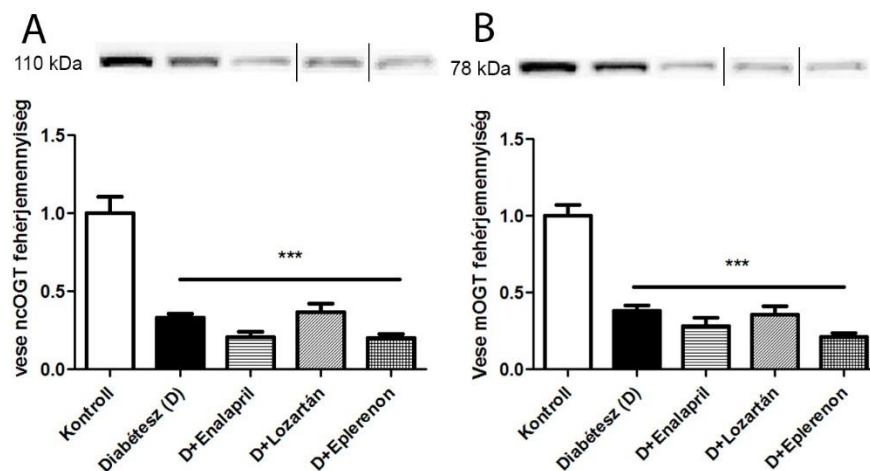
### 16. ábra. O–GlcNAciláció kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok veséjében

A: Reprezentatív immunoblottok a fehérjék O-GlcNAcilációs módosulásáról.

B: O-GlcNAcilált fehérjék mennyisége a kontroll, diabéteszes (D), Enalapril (D+ENA), Lozartán (D+LOS) és Eplerenon (D+EPL) kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban kontrollra való normalizálás után.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 8/\text{csoport}$ . \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontroll, \$\$\$ $p < 0,001$  vs. Diabétesz.

Elsőként mutattuk ki a vesében az OGT és OGA különböző izoformáit. Diabéteszes patkányokban a renális ncOGT és mOGT mennyisége lecsökkent, amit a RAAS-gátlók nem befolyásoltak (17. ábra A-B).



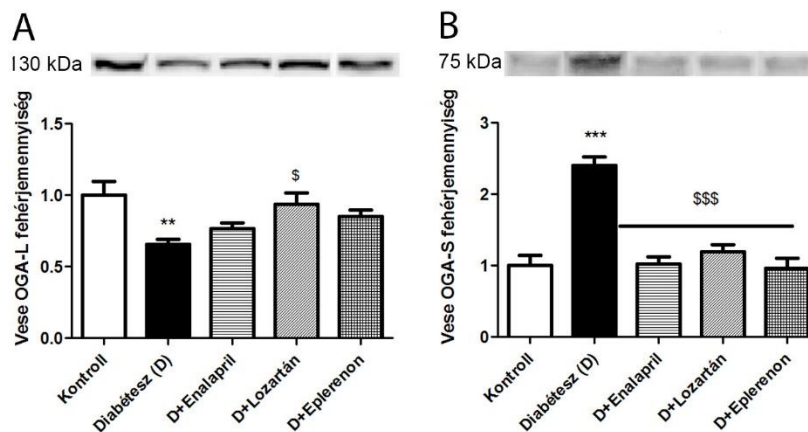
### 17. ábra. Az OGT izoformák fehérjemennyisége kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok veséjében

Az OGT izoformák mennyisége a kontroll, diabéteszes (D), Enalapril (D+ENA), Lozartán (D+LOS) és Eplerenon (D+EPL) kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban kontrollra való normalizálás után.

Reprezentatív immunoblottok a A: ncOGT, B: mOGT fehérjékről.

A grafikonok az ncOGT (A) és az mOGT (B) fehérjék relatív mennyiségét ábrázolják a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 8$ /csoport. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontroll.

Ugyancsak alacsony volt diabéteszes vesében az OGA-L mennyisége, míg a sejtmagban található és lipid-cseppekhez kötött OGA-S<sup>74; 75</sup> mennyisége megnőtt. A RAAS-gátlók közül egyedül a Lozartán mérsékelte az OGA-L csökkenését, míg az OGA-S mennyisége valamennyi kezelés esetében csökkent (18. ábra A-B).



### 18. ábra. Az OGA izoformák fehérjemennyisége kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok veséjében

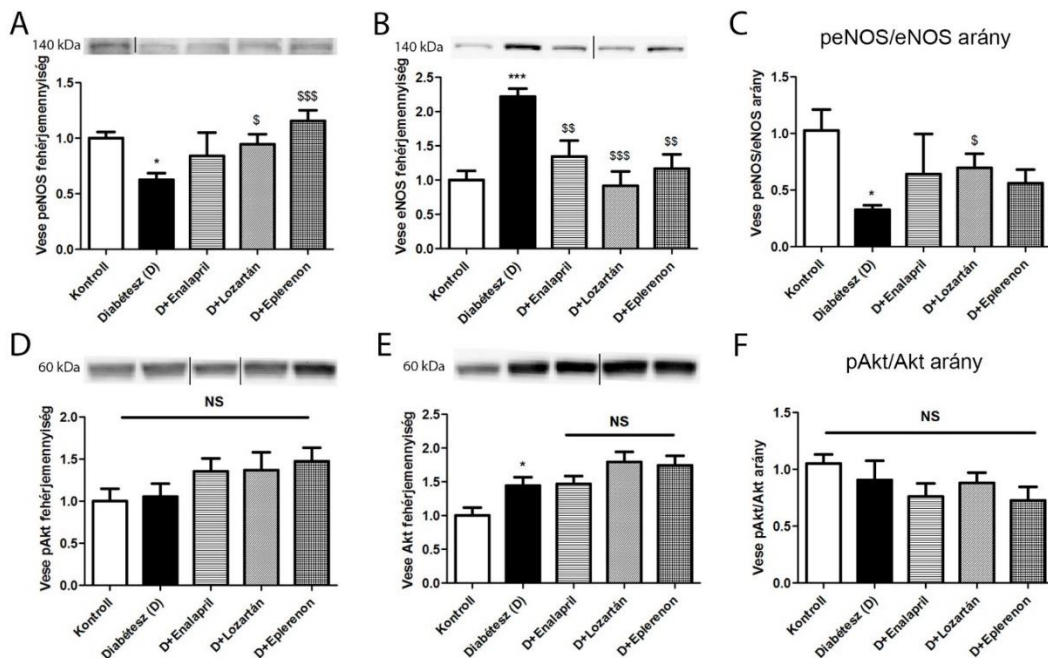
B: Az OGA izoformák fehérjék mennyisége a kontroll, diabéteszes (D), Enalapril (D+ENA), Lozartán (D+LOS) és Eplerenon (D+EPL) kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban kontrollra való normalizálás után.

Reprezentatív immunoblottok az A: OGA-L és B: OGA-S fehérjékről.

A grafikonok az OGA-L (A) és OGA-S (B) fehérjék relatív mennyiségét ábrázolják a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 8$ /csoport. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontroll, § $p < 0,05$ ; \$\$\$ $p < 0,001$  vs. Diabétesz.

#### 4.7. A RAAS-gátlók hatása az eNOS foszforilációra diabéteszes vesében

Diabéteszes vesében mind a foszforilált eNOS mennyisége, mind a peNOS/peNOS arány csökkent. A RAAS-gátlók, különös tekintettel a Lozartán és Eplerenon, megnövelték a peNOS mennyiségét, illetve mérsékeltek az emelkedett eNOS szintet (19. ábra A-C). Az Akt mennyisége kis mértékben emelkedett T1DM-ben, azonban sem a pAkt, sem a pAkt/Akt arány nem változott a cukorbeteg állatokban, illetve a RAAS-kezelés hatására (19. ábra D-F).



#### 19. ábra. Foszforilált eNOS és Akt fehérjesszintek a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok veséjében

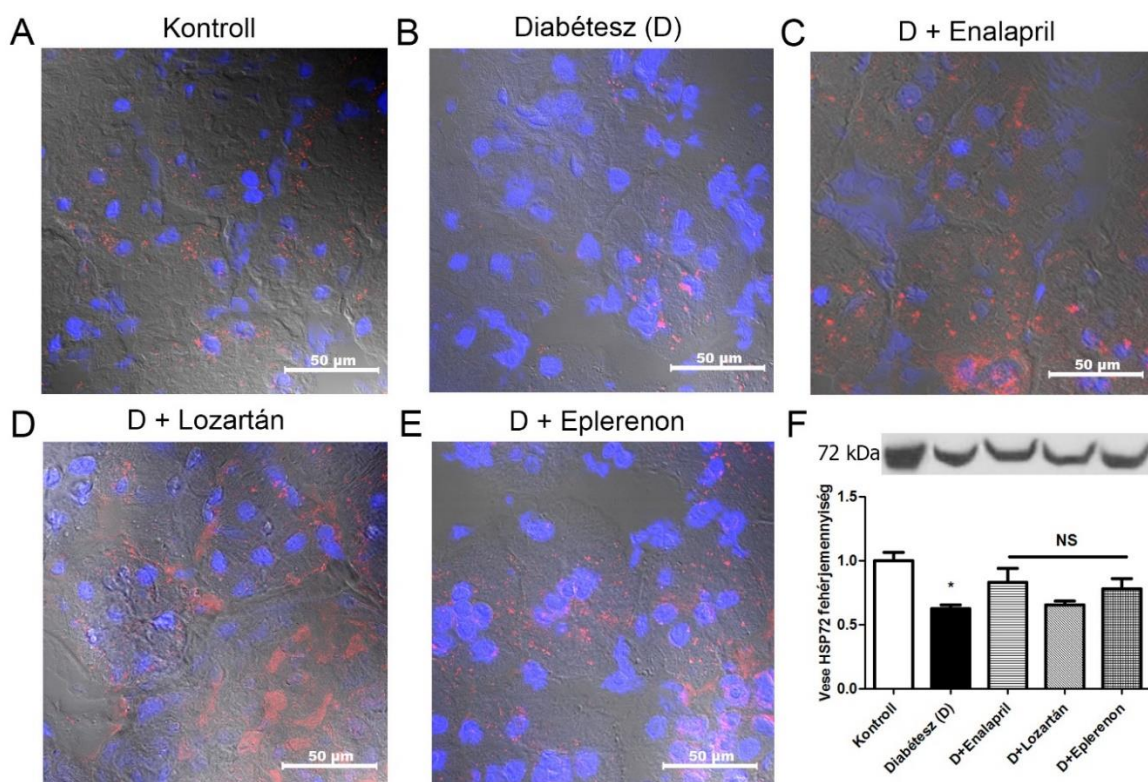
Reprezentatív immunoblottok a foszforilált eNOS (A), eNOS (B), foszforilált Akt (D) és Akt (E) szintekről.

A grafikonok az peNOS (A), eNOS (B) fehérjesszinteket, peNOS/eNOS arányt (C), pAkt (D), Akt (E) fehérjesszinteket és pAkt/Akt arányt (F) ábrázolják a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiból.

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk;  $n = 8$ /csoport \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontroll,  $^{\$}p < 0,05$ ;  $^{\$\$}p < 0,01$ ;  $^{\$ \$ \$}p < 0,001$  vs. Diabétesz. NS: nem szignifikáns.

#### 4.8. HSP72 fehérjemennyiség és lokalizáció változása diabéteszes vesében

A cukorbeteg állatok veséjében a HSP72 fehérje mennyiségének csökkenését figyeltük meg a kontrollokhöz képest, ami a RAAS-gátlókkal történő kezelés után egy mérsékelt növekedő tendenciát mutatott. Immunhisztológiai eljárással kimutattuk, hogy a fehérje a tubulusokba lokalizálódik (20. ábra).



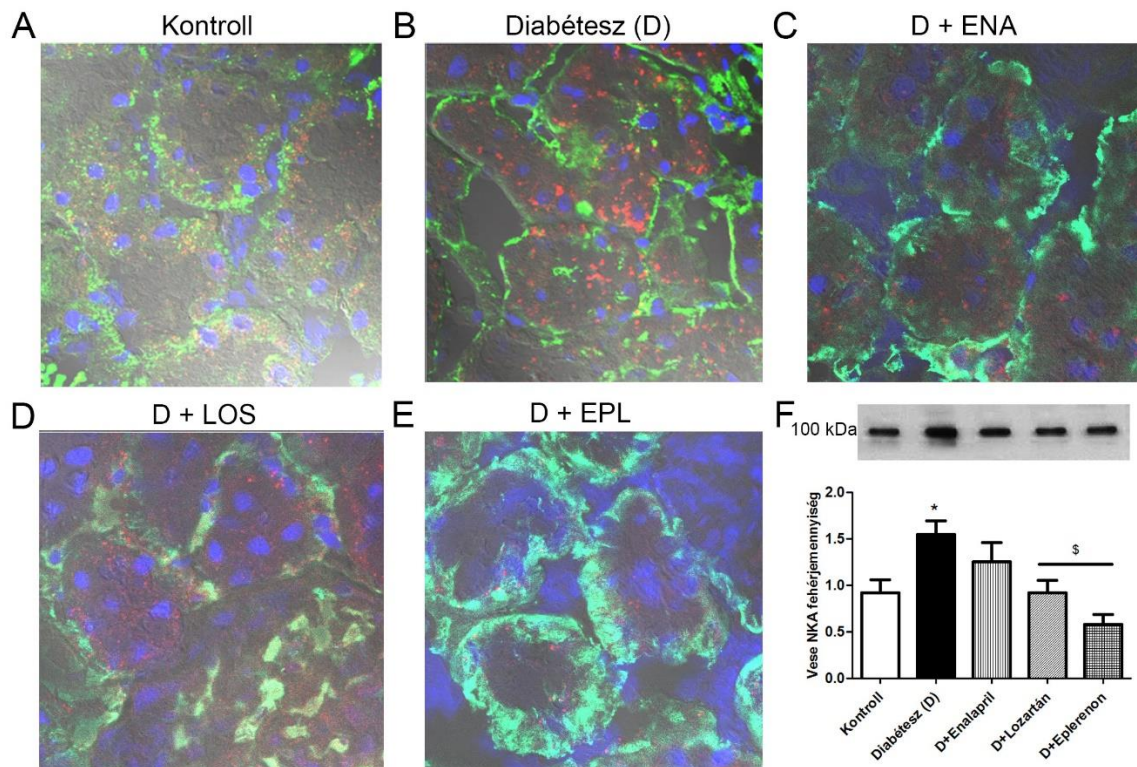
**20. ábra. HSP72 lokalizáció és fehérjemennyiség a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok veséjében**

Vesemetszetek immunfluoreszcens festett reprezentatív képei hő sokkfehérje 72-re (HSP72, piros) kontroll (A), diabéteszes (B), enalapril (C), lozartán (D) és eplerenon (E) kezelt diabéteszes patkányokban (630 x nagyítás). A sejtmagok Hoechst 33342-vel kékkel festődnek. F: Felső kép: reprezentatív immunoblottok a HSP72 szintekről. A grafikonok a HSP72 relatív fehérjemennyiségét ábrázolják a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban.

Az adatokat átlag $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk. \*\* $p < 0,01$  vs. Kontroll. NS: nem szignifikáns.

#### 4.9. A NKA fehérjemennyiség és lokalizáció változása diabéteszes vesében

Korábbi eredményeink alapján a NKA fehérje mennyisége nőtt az STZ-indukált diabéteszes vesében, ami AngII kezelés hatására tovább emelkedett <sup>40</sup>. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a diabéteszben megnövekedett NKA fehérjemennyisége az Enalapril kivételével a Lozartán és Eplerenon kezelése hatására csökkentek. Kimutattuk, hogy míg a kontroll állatokban a NKA a fiziológiás helyén, a tubuláris bazálmembránhoz kötötten található, addig T1DM-ben megemelkedett mennyiségű fehérje áthelyeződik a citoplazmába és megjelenik az apikális membránon. Immunfluoreszcens festett metszeteken látható, hogy a NKA a HSP72-vel kolokalizáltan helyezkedik el (21. ábra).



**21. ábra. Nátrium/kálium ATPáz (NKA)-HSP72 kolokalizáció és NKA fehérjemennyisége és a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok veséjében**

Kontroll (A), diabéteszes (B), enalapril (C), lozartán (D) és eplerenon (E) kezelt diabéteszes állatok veséinek immunfluoreszcens festett reprezentatív képei hőszokkfehérje 72-re (HSP72, piros) és nátrium/kálium ATPáz-ra (NKA, zöld). A sejtmagok Hoechst 33342-



vel kézzel festődnek (630 x nagyítás). F: Felső kép: reprezentatív immunoblottok a NKA szintekről. Alsó kép: a grafikonok a NKA relatív fehérjemennyiségét ábrázolják a kontroll, diabéteszes és RAAS-gátló kezelt diabéteszes állatok vesehomogenizátumaiban.

Az adatokat átlag $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll;  $\S p < 0,05$  vs. Diabétesz;  $\S\S p < 0,01$  vs. Diabétesz.  $n = 8$ /csoport.

## 5. Megbeszélés

Az O-GlcNAc-ácsolás az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosulás, melynek a glükotoxicitás közvetítésében, ill. a DM és szövődényeinek kialakulásában játszott szerepére az utóbbi évtizedben derült fény. Fontosságát bizonyították a T2DM patogenezisében és diabéteszes kardiomiopátiában, DNP-vel kapcsolatban azonban pontos szerepe nem ismert.

A DNP-ban a tubulussejtek károsodása kiemelt fontosságú, mivel a proximális tubulus van leginkább kitéve a glükózterhelésnek, ezért *in vitro* kísérleteinket HK2 proximális tubulussejtekben végeztük. *In vitro* modellben lehetővé válik a magas glükóz szint hatásainak közvetlen tanulmányozása, az *in vivo* modellben együtt jelentkező hipoinzulinémia és hiperozmolaritás hatásaitól elkülönülten. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a magas glükóz koncentrációjú táptalajon történő tenyésztés a fehérjék O-GlcNAc-ácsolásának megemelkedését váltotta ki. A sejtmagban és a citoplazmában megtalálható, szintetizálásért felelős ncOGT izoforma<sup>99</sup> mennyisége ugyancsak megnövekedett a proximális tubulussejtekben, azonban az emelkedés 48 órás kezelés hatására lecsengett. Mindez azt jelzi, hogy a glükózterhelés hatására az egyensúly az O-GlcNAc szintézis irányába tolódik, azonban hosszabb távú cukorterhelés következtében a szintetizáló enzim mennyisége kompenzatórikusan lecsökken a túlzott O-GlcNAc-ácsolás elkerülése érdekében. Hasonló szabályzási mechanizmust találtak cukorbeteg emberek vörösvérsejtjeiben is<sup>100</sup>.

A mitokondriumba lokalizált mOGT nem változott magas glükózkoncentráció hatására, azonban hosszabb kezelés után az enzim mennyiségének kompenzatórikus csökkenése következett be. Korábbi vizsgálatok azt feltételezték, hogy bár az enzim rendelkezik katalitikus aktivitással<sup>101</sup>, szubsztrátja, az UDP-GlcNAc nincs jelen a mitokondriumban<sup>102</sup>. Azonban a közelmúltban felfedezésre került, hogy az UDP-GlcNAc a pirimidin nukleotid és a deoxi nukleotid carrierek révén hatékonyan transzportálódik a belső membránon keresztül<sup>101</sup>. Az mOGT funkcióját tekintve egy kutatócsoport azt találta, hogy az enzim megnövekedett mennyisége apoptózist idéz elő a sejtben, ami részt vehet a diabéteszrel kapcsolatos programozott sejthalál kialakításában<sup>103</sup>. Kísérleti modellünkben az mOGT alacsony szintje az jelzi, hogy az alkalmazott glükózkoncentráció és kezelési idő nem idézett elő apoptózist, amit alátámaszt az is, hogy

a sejtek vialibitása normális volt. Ez összhangban áll más megfigyelésekkel, melyek szerint a vese tubuláris epithél sejtekben csak 72 órányi magas glükóz kezelés után nő az apoptózis mértéke <sup>104</sup>.

Az OGT-vel ellentétben az OGA úgy tűnik kevésbé érzékeny a glükózkoncentráció változásaira, annál inkább a celluláris O-GlcNAc szintekre. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy egy átmeneti csökkenés után, az OGA-L emelkedése következett be a proximális tubulusokban, ami egy adaptív válaszreakció lehet a megnövekedett O-GlcNAc szintre. Ez összhangban van azzal a korábbi tanulmánnyal, amelyben pre-diabéteszes betegek vörösvértestjeiben az OGA-L magasabb volt, azt sugallva, hogy a sejt próbál alkalmazkodni a hiperglikémiához a cukorbetegség korai stádiumában <sup>100</sup>.

Az OGA-S izoforma az OGA-L-hez képest alacsonyabb enzimaktivitású, ezért kevésbé vesz részt az O-GlcNAc csoportok eltávolításában <sup>77</sup>. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a proximális tubulusokban az OGA-S jóval kisebb mennyiségben van jelen, mint a másik izoforma. Eredményeink megegyeztek egy másik kísérlet adataival, ahol HeLa sejtekben <sup>75</sup> azt találták, hogy az enzim a proteasómában gyorsan lebomlik, ezért kevésbé detektálható. Mivel a DM vesében az enzim mennyisége mégis magas, a fentiek alapján feltételezhető, hogy nem a proximális epithélsejt az OGA-S fehérje fő expressziós helye a vesében.

Vizsgálataink során STZ-indukált diabéteszes patkánymodellben igazoltuk, hogy a vesében tartós hiperglikémia hatására az O-GlcNAc-alkilált fehérjék mennyisége megnő. A különböző lokalizációval és szubsztrát specificitással rendelkező izoenzimeket <sup>74; 105</sup> tanulmányozva elsőként mutattuk ki, hogy az emelkedett O-GlcNAc szint ellenére, a szintetizáló enzim mindkét izoformájának (ncOGT és mOGT) mennyisége és az eltávolítást végző OGA-L szintje alacsony. Ez azt jelzi, hogy krónikus DM-ben az O-GlcNAc-alkilált fehérjék magas szintje a nagyfokú felhalmozódás eredménye, amit nem képes ellensúlyozni a feltehetően kompenzatórikusan csökkent termelés, melyet az OGT alacsonyabb szintje jelez. Az eltávolítást végző OGA-L csökkenése szintén hozzájárulhat a felhalmozódáshoz. Krónikus diabéteszben továbbá az OGA-L csökkenése azt jelezheti, hogy az enzim nem képes többé reagálni a megnövekedett O-GlcNAc szintekre, így sokkal inkább a betegség progressziójának O-GlcNAc-szinttől független mutatója lehet. Hasonló megfigyeléseket tettek hasnyálmirigy rákban, ahol az enzimcsökkenés összhangban volt az állapotrosszabbodással <sup>106</sup>.

Az OGA-S izoforma, bár megemelkedett DM-ben, ennek ellenére alacsonyabb enzimaktivitása miatt<sup>77</sup> valószínűleg kevésbé vesz részt az O-GlcNAc csoportok eltávolításában. Mivel irodalmi adatok alapján ismert, hogy az OGA-S expresszióját a lipidfelhalmozódás emeli<sup>107</sup>, ezért feltételezzük, hogy az izoforma emelkedése a DM-indukált lipidfelhalmozódás következménye lehet. A klinikai tapasztalatok alapján a DM-ben fellépő zsíryanycsere károsodás elsősorban hipertrigliceridémiát okoz, de rossz metabolikus kontroll esetén a koleszterin szint is megnő<sup>108</sup>. Hasonló változásokat észleltünk a DM állatokban is, ahol magasabb koleszterin és triglicerid szinteket találtunk.

Egyre több bizonyíték jelzi, hogy a krónikus hatásokkal szemben, az O-GlcNAciláció akut emelkedése túlélést segítő jelátviteli utakat aktivál<sup>109</sup>. Kimutatták, hogy az O-GlcNAciláció fokozza a hipoxia elleni védelmet proximális tubulussejtekben<sup>110</sup>. Ismert, hogy a magas O-GlcNAc szint elősegíti a hősokk faktor transzlokációját és a HSP72 expresszióját, ami az egyik legjelentősebb stressz fehérje a vesében<sup>60 111</sup>. A HSP72 gátolja a renális epithelsejtek apoptózisát és javítja a sejtvédelmet a stressztimulusok ellen<sup>55; 112</sup>, ezen kívül NKA-val kolokalizálódva segít helyreállítani a pumpa működését<sup>113</sup>.

Mivel a hiperglikémia celluláris stresszt indukál, ezért az O-GlcNAciláció akut emelkedése a magas glükóz szint által indukált celluláris stresszválasz része lehet a proximális tubulussejtekben. *In vitro* kísérleteinkben, hiperglikémia hatására a HSP72 fehérjeszint átmeneti emelkedést követően 48 óra után lecsökkent. Ezzel párhuzamosan változott a NKA fehérje mennyisége is. Irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a magas glükózkoncentráció hatására fokozódó Na<sup>+</sup>-glükóz kotranszport a Na<sup>+</sup> felvétel növekedését okozza<sup>114</sup>, mely következményesen a NKA aktivitásának és mennyiségének növekedéséhez vezet.<sup>115</sup>

Az intracelluláris Na<sup>+</sup> indirekt hatása mellett az Ang II direkt serkentő hatása is feltételezhető<sup>116</sup>. Ismert, hogy az Ang II elsődlegesen az AT1-receptoron keresztül aktiválja a PKC-t mely fokozza a NKA működését<sup>117</sup>; de ezen kívül az Ang II hatás mediálásában számos más útvonal (AT2-receptor/NO/cGMP<sup>118</sup>, az Ang (1-7)/ MAS-receptor/ PKA<sup>119</sup> vagy az Ang (1-7)/ AT2-receptor/ PKG útvonal) módosító hatását is igazolták<sup>120</sup>.

Vizsgálataink során diabéteszes vesében az irodalmi adatokkal összhangban HSP72 szintje lecsökkent<sup>121</sup>. A NKA szintje pedig bár megemelkedett, azonban lokalizációja

megváltozott, a bazálmembránból az apikális membránra helyeződött át, így funkcióját veszítette, így összességében az enzimműködés károsodott. Mindez azt sugallja, hogy krónikus hiperglikémiában károsodik a stresszválasz, csökken a HSP72 szintézise, kevésbé érvényesül, a chaperon-funkció, a NKA helyreállítása zavart szenved, így fokozódik a DNP progressziója<sup>122; 123</sup>. Hasonló eredményekről számolnak be egy másik STZ-modellben ahol az antioxidáns alfa-lipolsav kezelés kivédte a hiperglikémia és az oxidatív stressz káros hatását, úgy hogy az antioxidáns enzimek aktivációja összefüggést mutatott a HSP70 és a HSP90 O-GlcNAcilációjának csökkenésével<sup>121</sup>.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink arra utalnak, hogy bár DNP-ban nő az O-GlcNAciláció, a hiperglikémiára adott stresszválasz elégtelen és a kontrollálatlanul O-GlcNAcilálódott fehérjék felhalmozódása a magas vércukorszint károsító hatásait közvetíti. Így a vese oxidatív stresszel szembeni érzékenysége nő.

Az elmúlt évtizedekben nyilvánvalóvá vált, hogy a DNP kialakulásában és progressziójában a NO rendszer károsodása patognomikus jelentőségű, azonban az NO szerepét mindeddig elsősorban a vese vaszkuláris endothéliumában hangsúlyozták. Kísérleteink során elsőként igazoltuk, hogy a hiperglikémia gátolja az eNOS aktivációjához kulcsfontosságú foszforilációt proximális tubulussejtekben. Ezzel párhuzamosan alacsony eNOS foszforilációt mutattunk ki a diabéteszes vesében is, annak ellenére, hogy a foszforilálatlan eNOS enzimszintje emelkedett<sup>124; 125</sup>. Mindez azt jelzi, hogy az eNOS rendszer diszfunkciója összefüggésben lehet az enzim foszforilációjának károsodásával.

Mivel jól ismert, hogy az O-GlcNAciláció kompetícióban van a fehérje foszforilációval<sup>78</sup>, ezért azt feltételezzük, hogy diabéteszben az O-GlcNAciláció hiperglikémia-indukált emelkedése szerepet játszik az eNOS csökkent foszforilációjában. Hasonló eredményre jutottak endothél sejtekben is, ahol a hiperglikémia növelte az eNOS O-GlcNAcilációt, míg az eNOS foszforilációt ellentétes irányban változtatta<sup>126</sup>. Diabéteszes állatok aortájában pedig az O-GlcNAciláció emelkedésével párhuzamosan csökkent az eNOS foszforilációja<sup>127; 128</sup>.

Jól ismert, hogy az eNOS aktivációjának fő közvetítője a pAkt, a szerin 1177-en történő foszforilációján keresztül<sup>43</sup>. Kimutatták, hogy az Akt is képes O-GlcNAcilálódásra, ami gátolja az enzim foszforilációját<sup>129; 130</sup>. *In vitro* kísérleteinkben azt találtuk, hogy egy enyhe emelkedés után az enzim mennyisége visszaállt a kontrollok

szintjére, annak ellenére, hogy a foszforilálatlan Akt mennyisége megnövekedett. Mindez arra utal, hogy az Akt foszforilációja is zavart szenved, így károsodik az eNOS foszforilációja is. Kimutattuk továbbá, hogy diabéteszes vesében megemelkedett Akt szint mellett is változatlan maradt a pAkt mennyisége. Feltételezéseink szerint diabéteszes állatokban az alacsony Akt foszforiláció a megnövekedett O-GlcNAciláció eredménye lehet. Továbbá az is elképzelhető, hogy nem csak a direkt O-GlcNAciláció, hanem az Akt O-GlcNAcilálódása is gátolja az eNOS foszforilációját, így aktivációját. Eredményeink magyarázatot adhatnak számos korábbi kutatási eredményre, melyben az Akt/eNOS foszforiláció csökkenését találták diabéteszes vesében <sup>131; 132</sup>.

Mivel a DNP patomechanizmusában a RAAS túlaktiválódása központi szerepet játszik, ezért a vesekárosodás kezelésében is a RAAS-gátlók az elsődlegesen választandó szerek. Jóllehet a diabéteszben megemelkedett koncentrációjú aldosteron önmagában is fontos patogenetikus faktora a progresszív vesekárosodásnak <sup>133</sup>, az aldosteron gátlására egyelőre csak kombinációban van lehetőség. A spironolaktont jelenleg adjuvánsként alkalmazzák DNP-ban, melynek széleskörű használatát mellékhatásai (pl. antiandrogén hatás) nagymértékben limitálják. Mivel a progeszteron és androgén receptorokhoz is kapcsolódik, ezért férfiakban impotencia és ginekomasztia, premenopauzális korban lévő nőknél menstruációs zavarok alakulhatnak ki <sup>134</sup>. Az eplerenon struktúrájának köszönhetően sokkal szelektívebben kötődik az aldosteron receptorokhoz és alacsonyabb az affinitása más szteroid receptorokhoz <sup>135</sup>, ezért kevesebb hátrányos mellékhatással rendelkezik. Mindezek ellenére a gyógyszer még mindig nincs törzskönyvezve DNP-ban, szívelégtelenségben azonban igazoltan csökkenti a kardiovaszkuláris mortalitást <sup>136</sup>.

Számos bizonyíték támasztja alá, hogy az aldosteron-blokád hozzájárulhat a vesekárosodás progressziójának gátlásához, sőt akár monoterápiában is hatékony lehet. Az aldosteron-antagonistákkal történő kezelés továbbá eredményes lehet a DNP-t kísérő kardiovaszkuláris komplikációk megelőzésében is <sup>134</sup>, mivel az aldosteron döntő szerepet játszik a kardiovaszkuláris károsodás kialakulásában, melynek előfordulása DNP-ben 15-20-szor gyakoribb <sup>9</sup>.

Irodalmi adatok alapján a spironolakton STZ-indukált diabéteszes vesében javítja a glomeruláris és tubulointersticiális gyulladás ill. fibrózis mértékét, feltehetően a

makrofág infiltráció, a PAI és a TGF  $\beta$ -1 gátlásán keresztül<sup>137</sup>. Az eplerenon T2DM állatmodellben alacsony dózisban csökkentia profibrotikus citokinek expresszióját, magas dózisban pedig javítja a glomeruloszklerózis mértékét<sup>138</sup>.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az ACE-gátlók vagy ARB-k mellett, az aldosteron-antagonisták is hatékonyan javították a vesefunkciót és szöveti károsodást T1DM-hez társuló DNP-ban monoterápiában<sup>95</sup>. Elsőként mutattuk ki továbbá, hogy a RAAS-gátló kezelések csökkentik a fehérjék megnövekedett O-GlcNAcilációját diabéteszes vesében, ezáltal a krónikus akkumuláció káros hatásait enyhíteni képesek.

Feltételezhető, hogy az intrarenális RAAS és az O-GlcNAciláció között kétirányú, egymást serkentő kapcsolat van. Igazolták, hogy mezangiumsejtekben az AngII a GFAT aktiválásán keresztül növeli a fehérjék O-GlcNAcilációját<sup>89</sup>. Proximális tubulussejtekben pedig a magas glükóz a HBP aktiválódásán keresztül fokozza az Ang gén expresszióját és sejthipertrófiát okoz.<sup>139</sup> Mindezekből arra következtethetünk, hogy az oda-vissza ható aktiválás egy ördögi kört hoz létre, ami hozzájárul a hiperglikémia által indukált káros hatásokhoz a vesében.

Eredményeink szerint a RAAS-rendszer gátlása a fehérjék O-GlcNAcilációját csökkenti. Méréseink alapján úgy tűnik, hogy ez a hatás nem a szintézist végző OGT szintjének csökkentésén, hanem elsődlegesen az eltávolítást végző OGA-L mennyiségének növekedésén keresztül jön létre. A DM-ben megemelkedett OGA-S esetében az enzim mennyiségének csökkenését figyeltük meg RAAS-gátló kezelés hatására. Mivel ismert, hogy az OGA-S expresszió és a lipidszintek között pozitív korreláció van<sup>107</sup>, feltételezhető, hogy az enzim szintjének csökkenéséhez a RAAS-gátlók lipidszintcsökkentő hatása is jelentősen hozzájárul.

PhD-munkám során az O-GlcNAciláció jelentőségét tanulmányoztuk a DNP patomechanizmusában. Kimutattuk az O-GlcNAciláció enzimeinek, az OGT-nek és OGA-nak az időfüggő és izoforma-specifikus változásait hiperglikémiás körülmények között. Igazoltuk, hogy az Akt/eNOS foszforiláció és a HSP72 expresszió csökkenése hozzájárulhat a Na-pumpa zavart működéséhez. Végül kimutattuk, hogy a RAAS-gátlók javítják a krónikusan felhalmozódott O-GlcNAcilálódott fehérjék mennyiségét. Mindezekkel az adatokkal a RAAS-gátlók renoprotektív hatásának hátterében álló új hatásmechanizmust sikerült igazolnunk.

A DNP megfelelő és hatékony terápia nélkül végstádiumú veseelégtelenséghez vezet, melynek egyetlen terápiás lehetősége a vesepótló kezelés. A veseműködés megőrzésének szempontjából tehát kulcsfontosságú a korai változások megértése, a rendelkezésre álló kezelési módszerek hatásmechanizmusának megismerése és a progresszió megakadályozását célzó új terápiás lehetőségek megtalálása. Eredményeink ezeknek a céloknak a megvalósítását segíthetik elő.



## 6. Következtetések

1. Igazoltuk, hogy az O-GlcNAciláció mértéke megnő magas glükóz kezelés hatására proximális tubulussejtekben illetve DNP-ben.

2. Elsőként mutattuk ki az O-GlcNAciláció enzimeinek különböző izoformáit és azok mennyiségének időfüggő változásait. Glükózterhelés hatására proximális tubulussejtekben az O-GlcNAcilációban szerepet játszó ncOGT, majd kompenzatórikus hatásként az eltávolítást végző OGA-L mennyisége is megnő. Elhúzódó hiperglikémia esetén enzimek szintjei lecsökkennek, ami a felhalmozódott O-GlcNAcilációra adott, részben károsodott válaszreakció lehet.

3. Proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés hatására és diabéteszes vesében a foszforilált eNOS mennyisége lecsökkent, míg az eNOS szint változatlan maradt, ami arra utal, hogy az O-GlcNAciláció megemelkedésének egyik káros következménye az eNOS foszforilációjának gátlása lehet.

4. Magas glükóz kezelés hatására a NKA és a HSP72 fehérjemennyisége megemelkedik és a HSP72 perinukleáris lokalizáció helyett az egész citoplazmában megjelenik. DNP-ben a NKA funkciója károsodik, mert fiziológiás helyéről áthelyeződik a citoplazmába, a vele kolokalizáltan elhelyezkedő HSP72 szintje pedig lecsökken, ami a glükototoxicitással szembeni sérülékenységhez vezet.

5. A RAAS-gátlók csökkentik a DNP-ben megnövekedett O-GlcNAcilációt feltételezhetően az OGA-L növelésén keresztül és növelik a peNOS ill. a HSP72 szinteket, ami hozzájárulhat renoprotektív hatásukhoz DNP-ben.

## 7. Összefoglalás

A diabétesz mellitusz (DM) és társuló szövődményei világméretű gondot okoznak, megelőzésük és kezelésük hatalmas terhet jelent a betegeknek és a társadalomnak egyaránt. A cukorbetegség számos szövődménye közül a diabéteszes nefropátia (DNP) a felnőttkori végállapotú veseelégtelenség leggyakoribb kóroka. Bár a betegek száma világszerte és hazánkban is folyamatosan nő, a DNP pontos patomechanizmusa nem tisztázott és az oki terápia továbbra sem megoldott. A jelenleg rendelkezésre álló gyógyszerek közül az angiotenzin konvertáz gátlók (ACE-gátlók) és angiotenzin receptor blokkolók (ARB) az elsőként választandó szerek, melyek ugyan lassítják a progresszió mértékét, de a betegek jelentős hányada így is dialízisre vagy vesetranszplantációra szorul<sup>140</sup>.

Ismert, hogy a hexózamin-bioszintézis fokozott aktivitása és a fehérjék megnövekedett O-GlcNAcilációs poszttranszlációs módosulása jelentősen hozzájárul a diabéteszes károsodások kialakulásához. Az O-GlcNAcilációs folyamat szerepe azonban DNP-ben kevésbé vizsgált.

A disszertáció bemutatja DNP patomechanizmusát, kiemelve a renális O-GlcNAciláció - mint jelentős patognomikus faktor – szerepét, tárgyalja a RAAS gátlók renoprotektív hatásának hátterében álló lehetséges patomechanizmusokat, külön kitérve a Na<sup>+</sup> pumpa működésének változásaira.

A diabétesz és a RAAS-gátlók hatását a különböző fehérjékre Enalaprillal, Losartannal és Eplerenonnal kezelt streptozotocin indukált diabéteszes patkányokon tanulmányoztuk. A hiperglikémia direkt hatását az O-GlcNAciláció folyamatára és enzimjeire, illetve az Akt-nitrogén oxid útvonalra *in vitro* körülmények között is vizsgáltuk.

Elsőként igazoltuk, hogy a hiperglikémia a proximális tubulussejtekben fokozza a fehérjék O-GlcNAcilációját. Ezzel párhuzamosan diabéteszes patkány modellben a megnövekedett O-GlcNAcilációt az OGT és OGA szintek csökkenése kíséri. A RAAS-gátlók csökkentik a diabétesz indukált vesekárosodást, megátolva az O-GlcNAciláció emelkedését és a pAkt, peNOS és HSP72 fehérjék mennyiségének csökkenését.

Azt reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak a DNP patomechanizmusának jobb megértéséhez és segíthetik a hatékonyabb megelőzési és kezelési stratégiák kidolgozását.

## 8. Summary

Diabetes mellitus (DM) and associated complications cause major public health problems and its prevalence and treatment are an enormous burden both to the patients and society. Among several complications, diabetic nephropathy (DNP) is the leading cause of end stage renal failure in the adult population. Although the number of patients are increasing worldwide as well as in Hungary, the exact pathomechanism of the disease is still unknown and the causal therapy is lacking. Currently the first line clinical treatments are the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)-inhibitors, which delay the progression, but still numerous patients are requiring dialysis or renal transplantation.

It is well known, that the increased activity of hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation is a known contributor of diabetic complications, however its relevance in DNP is poorly elucidated.

This work presents the pathomechanism of DNP, underlines the role of renal O-GlcNAcylation- as a significant pathogenic factor and discusses the possible pathomechanism of the renoprotective effects of RAAS-blockers by emphasising the relevance of the sodium-potassium pump.

Here we studied the effects of diabetes and RAAS-inhibitors of the various proteins in Enalapril, Losartane and Eplerenone-treated streptozotocin-induced diabetic rats. The direct effects of hyperglycemia on the process and enzymes of O-GlcNAcylation and on the Akt-nitric oxide pathway were evaluated also on proximal tubular cells. We firstly demonstrated, that hyperglycemia enhances protein O-GlcNAcylation in proximal tubular cells. In parallel *in vivo* in diabetic rat model the increasing O-GlcNAcylation was accompanied by the decrease of OGT and OGA levels. RAAS-inhibitors inhibited the diabetes induced renal failure, prevented the increase of O-GlcNAcylation and the decrease of pAkt, peNOS and HSP72 levels.

We hope that our results significantly promotes the better understanding of the pathophysiological background of DNP and helps to find more efficient preventing and treatment strategies.

## 9. Irodalomjegyzék

- 1 Szollár L. A szénhidrát anyagcsere zavarai. Cukorbetegség (diabetes mellitus). In: Szollár L. (szerk.). Kórélettan. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2005: 187-207.
- 2 Jermendy G, Hosszúfalusi N. Diabetes Mellitus. In: Tulassay Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2007: 1513-1568.
- 3 IDF. Diabetes atlas-7th edition 2016.
- 4 Jermendy Gy. Nemzeti Diabetesprogram 2011. Diabetol. Hung., 2011:39.
- 5 Belgyógyászati Szakmai Kollégium, Magyar Diabetes Társaság. A diabetes mellitus kórismézéséről, a cukorbetegség kezeléséről és gondozásáról a felnőttkorban 2011.
- 6 Chamberlain JJ, Rhinehart AS, Shaefer CF Jr, Neuman A. Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes. Ann Intern Med, 2016: 542:52.
- 7 Fazeli Farsani S, van der Aa MP, van der Vorst MM, Knibbe CA, de Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. Diabetologia, 2013: 1471-88.
- 8 Pinas-Hamiel O, Zeitler P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. Lancet, 2007: 1823-31.
- 9 Belgyógyászati Szakmai Kollégium, Magyar Nephrológiai Társaság. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja. A diabéteszes nephropathia vizsgálata és kezelése. 2008
- 10 Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res, 2010: 1058-70.
- 11 Davidson MB, Bate G, Kirkpatrick P. Exenatide. Nat Rev Drug Discov, 2015: 713-4.
- 12 Luo, X, Wu J, Jing S, Yan LJ. Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. Aging Dis, 2016: 90-110.
- 13 Cochrane SM, Byrne JC, Robinson GB. The permselectivity of glomerular basement membrane can be compromised by glycation or by exposure to low levels of hypochlorite. Biochim Biophys Acta, 1997: 217-28.

- 14 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*,2001: 813-20.
- 15 Marshall SM. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: has the outlook improved since the 1980s? *Diabetologia*, 2012: 2301-6.
- 16 Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*,1999: 795-808
- 17 Chiarelli F, Verrotti A, Mohn A, Morgese G. The importance of microalbuminuria as an indicator of incipient diabetic nephropathy: therapeutic implications. *Ann Med*, 1997: 439-45.
- 18 Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol*, 1999: 2569-76.
- 19 Jaimes EA, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H. Human glomerular endothelium: interplay among glucose, free fatty acids, angiotensin II, and oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol*,2010: 125-32.
- 20 Rosta K. A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPáz szerepe a diabetes mellitus patomechanizmusában. (PhD). Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem, Budapest. 2009.
- 21 Gerő L. A diabéteszes nefropátia kezelési lehetőségei. *Diabetes*,2010: 8-10.
- 22 Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, Babazono T, Moriya T, Makino H, Kimura K, Suzuki Y, Wada T, Ogawa S, Inaba M, Kanno Y, Shigematsu T, Masakane I, Tsuchiya K, Honda K, Ichikawa K, Shide K. A new classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 2015: 1-5.
- 23 Csecsemő-és Gyermekgyógyászati Szakmai Kollégium. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja. Krónikus veseelégtelenség, dialízis kezelésről 2006.
- 24 Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011: 1009-22.
- 25 Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol*, 2012: 351-75.
- 26 Shiota A, Yamamoto K, Ohishi M, Tatara Y, Ohnishi M, Maekawa Y, Iwamoto Y, Takeda M, Rakugi H. Loss of ACE2 accelerates time-dependent glomerular and tubulointerstitial damage in streptozotocin-induced diabetic mice. *Hypertens Res*, 2010: 298-307.

- 27 Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med*, 2011: 11.
- 28 Roscioni SS, Heerspink HJ, De Zeeuw D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 2014: 77-87.
- 29 Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology*, 1995: 2-8.
- 30 Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*, 2000: 93-8.
- 31 Shalamanova L, Wilkinson MC, McArdle F, Jackson MJ, Rustom R. Characterisation of the expression of the Renin-Angiotensin system in primary and immortalised human renal proximal tubular cells. *Nephron Exp Nephrol*, 2010: 53-61.
- 32 Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology*, 2002: 2975-85.
- 33 Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G, Imig JD, Navar LG, Burns KD. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int*, 2000: 2320-30.
- 34 Mazak I. et al. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 2004: 2792-800.
- 35 Siragy HM, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol*, 2008: 817-24.
- 36 Rentoukas EI, Lazaros GA, Ziogiannis PN. Aldosterone in Heart and Kidney Diseases. *Hellenic Journal of Cardiology*, 2005: 408-419.
- 37 Fonyó A. A vese kiválasztó működésének alapjai. In: Fonyó A, Ligeti E. (szerk) *Az Orvosi Élettan Tankönyve*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2008: 303-332.
- 38 Ziyadeh FN, Cohen MP. Effects of glycated albumin on mesangial cells: evidence for a role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem*, 1993: 19-25.
- 39 Bharatula M, Hussain T, Lokhandwala MF. Angiotensin II AT1 receptor/signaling mechanisms in the biphasic effect of the peptide on proximal tubular Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Clin Exp Hypertens*, 1998: 465-80.
- 40 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is

modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney--another reason for diabetic nephropathy? *J Physiol*, 2008: 5337-48.

- 41 Gallicchio MA, Bach LA. Advanced glycation end products inhibit Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase in proximal tubule epithelial cells: role of cytosolic phospholipase A2alpha and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase gamma. *Biochim Biophys Acta*, 2010: 919-30.
- 42 Sharma S. Nitric oxide and the kidney. *Indian Journal of Nephrology*, 2004.
- 43 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 1999: 601-5.
- 44 Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007: 1261-74.
- 45 Zou AP, Cowley A. W. Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. *Curr Hypertens Rep*, 1999: 178-86.
- 46 Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 2012: 829-37.
- 47 Triggle CR, Ding H. A review of endothelial dysfunction in diabetes: a focus on the contribution of a dysfunctional eNOS. *J Am Soc Hypertens*, 2010: 102-15.
- 48 Cheng H, Harris RC. Renal endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2014: 22-33.
- 49 Goligorsky MS, Chen J, Brodsky S. Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide. *Hypertension*, 2001: 744-8.
- 50 Guinez C, Mir AM, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007: 414-20.
- 51 Ziemienowicz A, Zylicz M, Floth C, Hübscher U. Calf thymus Hsc70 protein protects and reactivates prokaryotic and eukaryotic enzymes. *J Biol Chem*, 1995: 15479-84.
- 52 Barutta F, Pinach S, Giunti S, Vittone F, Forbes JM, Chiarle R, Arnstein M, Perin PC, Camussi G, Cooper ME, Gruden G. Heat shock protein expression in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008: 1817-24.
- 53 Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui Si S, Mori I, Tang SS, Ingelfinger JR, Kimura S, Nagai R. Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the



- kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II. *Hypertension*, 2002: 122-8.
- 54 Beck FX, Neuhofer W, Müller E. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002: 203-15.
- 55 Mao H, Li Z, Zhou Y, Li Z, Zhuang S, An X, Zhang B, Chen W, Nie J, Wang Z, Borkan SC, Wang Y, Yu X. HSP72 attenuates renal tubular cell apoptosis and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008: 202-14.
- 56 Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*, 1990: 242-51.
- 57 Aufricht C, Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, Van Why SK. ATP releases HSP-72 from protein aggregates after renal ischemia. *Am J Physiol*, 1998: 268-74.
- 58 Uchiyama T, Atsuta H, Utsugi T, Oguri M, Hasegawa A, Nakamura T, Nakai A, Nakata M, Maruyama I, Tomura H, Okajima F, Tomono S, Kawazu S, Nagai R, Kurabayashi M. HSF1 and constitutively active HSF1 improve vascular endothelial function (heat shock proteins improve vascular endothelial function). *Atherosclerosis*, 2007: 321-9.
- 59 Malyshev I, Manukhina EB, Mikoyan VD, Kubrina LN, Vanin AF. Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Lett*, 1995: 159-62.
- 60 Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, McKen C, Zachara NE. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *J Biol Chem*, 2010: 39096-107.
- 61 Association AD. Microvascular complications and foot care. *Diabetes Care*, 2015: 58-66.
- 62 Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators . Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet*, 2000: 253-9.
- 63 Bilous R, Chaturvedi N, Sjølie AK, Fuller J, Klein R, Orchard T, Porta M, Parving HH. Effect of candesartan on microalbuminuria and albumin excretion rate in diabetes: three randomized trials. *Ann Intern Med*, 2009: 11-20.
- 64 Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK; AVOID Study Investigators. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*, 2008: 2433-46.

- 65 Traxinger RR, Marshall S. Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *J Biol Chem*, 1991: 10148-54.
- 66 Mcknight GL, Mudri SL, Mathewes SL, Traxinger RR, Marshall S, Sheppard PO, O'Hara PJ. Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem*, 1992: 25208-12.
- 67 Love DC, Hanover JA. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE*, 2005: 13.
- 68 Wells L, Whelan SA, Hart GW. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003: 435-41.
- 69 Fülöp N, Degrell P, Pajor L, Chatham JC, W I. Nephropathia diabetica és O-glikoziláció. *Hypertonia és Nephrologia*, 2007: 320-325.
- 70 Wang Z, Gucek M, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008: 13793-8.
- 71 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002: 1912-34.
- 72 Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics*, 2013: 365-80.
- 73 Fülöp N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 2007: 288-97.
- 74 Comtesse N, Maldener E, Meese E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001: 634-40.
- 75 Keembiyehetty CN, Krzeslak A, Love DC, Hanover JA. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J Cell Sci*, 2011: 2851-60.
- 76 Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Ishani A, Johansen K, Kasiske BL, Kutner N, Liu J, St Peter W, Guo H, Hu Y, Kats A, Li S, Li S, Maloney J, Roberts T, Skeans M, Snyder J, Solid C, Thompson B, Weinhandl E, Xiong H, Yusuf A, Zaun D, Arko C, Chen SC, Daniels F, Ebben J, Frazier E, Johnson R, Sheets D, Wang X, Forrest B, Berrini D, Constantini E, Everson S, Eggers P, Agodoa L. US Renal Data System 2013 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis*, 2014: A7.

- 77 Li J, Huang CL, Zhang LW, Lin L, Li ZH, Zhang FW, Wang P. Isoforms of human O-GlcNAcase show distinct catalytic efficiencies. *Biochemistry (Mosc)*, 2010: 938-43.
- 78 Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*, 2011: 825-58.
- 79 Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006: E1-E8.
- 80 Lazarus BD, Love DC, Hanover JA. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology*, 2006: 415-21.
- 81 Srinivasan V, Sandhya N, Sampathkumar R, Farooq S, Mohan V, Balasubramanyam M. Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) gene expression and activity in patients with type 2 diabetes: inter-relationships with hyperglycaemia and oxidative stress. *Clin Biochem*, 2007: 952-7.
- 82 Nerlich AG, Sauer U, Kolm-Litty V, Wagner E, Koch M, Schleicher ED. Expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes*, 1998: 170-8.
- 83 Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. 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: 4706-12.
- 84 Parker GJ, Lund KC, Taylor RP, McClain DA. Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*, 2003: 10022-7.
- 85 Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nagamatsu S, Hirano H, Kawakami H. 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: 127-40.
- 86 Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. 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: 2820-5.
- 87 Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*, 2008: 964-9.

- 88 Whelan SA, Lane MD, Hart GW. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J Biol Chem*, 2008: 21411-7.
- 89 James LR, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW. Angiotensin II activates the GFAT promoter in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001: 151-62.
- 90 Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*, 1998: 160-9.
- 91 Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG. Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes*, 2000: 863-71.
- 92 Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Thaiss F, Zahner G, Stahl RA. High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol*, 1997: 348-56.
- 93 Park MJ, Kim DI, Lim SK, Choi JH, Han HJ, Yoon KC, Park SH. High glucose-induced O-GlcNAcylated carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) mediates mesangial cell lipogenesis and fibrosis: the possible role in the development of diabetic nephropathy. *J Biol Chem*, 2014: 13519-30.
- 94 James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW. Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation. *Diabetes*, 2002: 1146-56.
- 95 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 streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *PLoS One*, 2012: 39938.
- 96 Maeda CY, Fernandes TG, Lulhier F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res*, 1995: 497-501.
- 97 Hashimoto M, Harada T, Ishikawa T, Obata M, Shibutani Y. Investigation on diabetic autonomic neuropathy assessed by power spectral analysis of heart rate variability in WBN/Kob rats. *J Electrocardiol*, 2001: 243-50.
- 98 Dias LD, Casali KR, Leguisamo NM, Azambuja F, Souza MS, Okamoto M, Machado UF, Irigoyen MC, Schaan BD. Renal denervation in an animal model of diabetes and hypertension: impact on the autonomic nervous system and nephropathy. *Cardiovasc Diabetol*, 2001: 33.

- 99 Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*, 1997: 9316-24, 1997.
- 100 Park K, Saudek CD, Hart GW. Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes*, 2010: 1845-50.
- 101 Banerjee PS, Ma J, Hart GW. Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015: 6050-5.
- 102 Love DC, Kochan J, Cathey RL, Shin SH, Hanover JA. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci*, 2003: 647-54.
- 103 Shin SH, Love DC, Hanover JA. Elevated O-GlcNAc-dependent signaling through inducible mOGT expression selectively triggers apoptosis. *Amino Acids*, 2011: 885-93.
- 104 Zhao X, Liu G, Shen H, Gao B, Li X, Fu J, Zhou J, Ji Q. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells. *Int J Mol Med*, 2014: 684-92.
- 105 Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys*, 2003: 287-97.
- 106 Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 2013: 15121-30.
- 107 Kiss E, Kränzlin B, Wagenblaß K, Bonrouhi M, Thiery J, Gröne E, Nordström V, Teupser D, Gretz N, Malle E, Gröne HJ. Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia-induced renal damage: prevention by liver X receptors. *Am J Pathol*, 2013: 727-41.
- 108 Biesenbach G. [Disorders of lipid metabolism in diabetes mellitus]. *Wien Med Wochenschr Suppl*, 1989: 9-17.
- 109 Chatham JC, Nöt LG, Fülöp N, Marchase RB. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock*, 2008: 431-40.
- 110 Suh HN, Lee YJ, Kim MO, Ryu JM, Han HJ. Glucosamine-induced Sp1 O-GlcNAcylation ameliorates hypoxia-induced SGLT dysfunction in primary cultured renal proximal tubule cells. *J Cell Physiol*, 2014: 1557-68.

- 111 Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*, 2004: 30133-42.
- 112 Ruchalski K, Mao H, Singh SK, Wang Y, Mosser DD, Li F, Schwartz JH, Borkan SC. HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003: 1483-93.
- 113 Fekete A, Vannay A, Vér A, Rusai K, Müller V, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006: 806-11.
- 114 Bank N, Aynedjian HS. Progressive increases in luminal glucose stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rats. *J Clin Invest*, 1990: 309-16.
- 115 Stanton BA, Kaissling B. Regulation of renal ion transport and cell growth by sodium. *Am J Physiol*, 1989: 1-10.
- 116 Garvin JL. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in rat proximal straight tubules. *J Am Soc Nephrol*, 1991: 1146-52.
- 117 Marsigliante S, Muscella A, Elia MG, Greco S, Storelli C. Angiotensin II AT1 receptor stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase activity through a pathway involving PKC-zeta in rat thyroid cells. *J Physiol*, 2003: 461-70.
- 118 Hakam AC, Hussain T. Angiotensin II AT2 receptors inhibit proximal tubular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity via a NO/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006: 1430-6.
- 119 Lara LS, Vives D, Correa JS, Cardozo FP, Marques-Fernades MF, Lopes AG, Caruso-Neves C. PKA-mediated effect of MAS receptor in counteracting angiotensin II-stimulated renal Na<sup>+</sup>-ATPase. *Arch Biochem Biophys*, 2010: 117-22, 2010.
- 120 Lara LA. S, Cavalcante F, Axelband F, De Souza AM, Lopes AG, Caruso-Neves C. Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT2-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na<sup>+</sup>-ATPase by Ang-(1-7). *Biochem J*, 2006: 183-90.
- 121 Arambasic J, Mihailović M, Uskoković A, Dinić S, Grdović N, Marković J, Poznanović G, Bajec D, Vidaković M. 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: 1461-73.

- 122 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: 29-39.
- 123 Oksala NK, Lappalainen J, Laaksonen DE, Khanna S, Kaarniranta K, Sen CK, Atalay M. Alpha-lipoic Acid modulates heat shock factor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Antioxid Redox Signal*, 2007: 497-506.
- 124 Baines A, Ho P. Glucose stimulates O<sub>2</sub> consumption, NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002: 286-93.
- 125 Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Namorado Mdel C, Bautista-García P, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Reyes JL. All-trans retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model. *J Nutr Biochem*, 2015: 441-54.
- 126 Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. 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: 466-72.
- 127 Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*, 2001: 1341-8.
- 128 Beleznai T, Bagi Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vascul Pharmacol*, 2012: 115-21.
- 129 Luo B, Soesanto Y, McClain DA. Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting Akt activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008: 651-7.
- 130 Goldberg H, Whiteside C, Fantus IG. O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011: 713-26.
- 131 Toba H, Sawai N, Morishita M, Murata S, Yoshida M, Nakashima K, Morita Y, Kobara M, Nakata T. Chronic treatment with recombinant human erythropoietin exerts renoprotective effects beyond hematopoiesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur J Pharmacol*, 2009: 106-14.
- 132 Kim HW, Lim JH, Kim MY, Chung S, Shin SJ, Chung HW, Choi BS, Kim YS, Chang YS, Park CW. 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: 1173-88.

- 133 Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. The regulation of cell growth and survival by aldosterone. *Front Biosci*, 2011: 440-57.
- 134 Epstein M. Aldosterone blockade: an emerging strategy for abrogating progressive renal disease. *Am J Med*, 2006: 912-9.
- 135 Struthers A, Krum H, Williams GH. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol*, 2008: 153-8.
- 136 Dhillon S. Eplerenone: a review of its use in patients with chronic systolic heart failure and mild symptoms. *Drugs*, 2013: 1451-62.
- 137 Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, Ishibashi S. Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int*, 2004: 1493-502.
- 138 Ahn JH, Hong HC, Cho MJ, Kim YJ, Choi HY, Eun CR, Yang SJ, Yoo HJ, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kim NH. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the development of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rats. *Diabetes Metab J*, 2012: 128-35.
- 139 Hsieh TJ, Fustier P, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Fantus IG, Hamet P, Chan JS. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology*, 2003: 4338-49.
- 140 Foley RN, Murray AM, Li S, Herzog CA, McBean AM, Eggers PW, Collins AJ. 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: 489-95.



## 10. Saját publikációk bibliográfiai adatai

### 10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Gellai Renata, Hodrea Judit, Lenart Lilla, Hosszu Adam, Koszegi Sandor, Balogh Dora, Ver Agota, Banki Nora F, Fülöp Norbert, Molnar Agnes, Wagner Laszlo, Vannay Adam, Szabo J Attila, Fekete Andrea: The role of O-linked N-Acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy. American Journal of Physiology: Renal Physiology. (2016)

Bánki Nóra Fanni, Kőszegi Sándor, Wagner László, Lénárt Lilla, Varga Dóra, Gellai Renáta, Hodrea Judit, Vér Ágota, Szabó J. Attila, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea: Új terápiás támpontok a diabéteszes nefropátia kezelésében: a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és a Na/K ATPáz szerepe. Gyermekgyógyászat (2013)

NF Banki, A Ver, LJ Wagner, A Vannay, P Degrell, A Prokai, R Gellai, L Lenart, D Nagy Szakal, E Kenesei, K Rosta, G Reusz, AJ Szabo, T Tulassay, C Baylis, A Fekete: Aldosterone Antagonists in Monotherapy are Protective Against Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats. Plos One (2012) 7:e39938

### 10.2. Más témában megjelent publikációk

Hodrea Judit, Lénárt Lilla, Gellai Renáta, Kőszegi Sándor, Wagner László, Bánki N Fanni, Vér Ágota, Vannay Ádám, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea: A diabeteshez társuló depresszió patomechanizmusa. Magyar Belorvosi Archivum 66:(4)pp. 198-203.(2013)

## 11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak, hogy lehetővé tették, hogy a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végezhettem munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Fekete Andreának, hogy szakértelmével, következetességével mindvégig támogatta fejlődésemet és szakmai, ill. emberi segítségével mindig készen állt a munkám során felmerülő nehézségek megoldására.

Köszönöm Dr. Vér Ágotának, Dr. Hodrea Juditnak, Dr. Wágner Lászlónak és Dr. Vannay Ádámnak, hogy észrevételeikkel, tapasztalataikkal és önzetlen hozzáállásukkal segítettek a munkám során.

Hálával tartozom a Semmelweis Egyetem és Magyar Tudományos Akadémia Kutatólaboratórium valamennyi munkatársainak, hogy barátságos hangulatot és támogató légkört biztosítottak az együtt töltött időszakban.

Külön köszönettel tartozom Kőszegi Sándornak, a hisztológiai munkák elkészítéséért, Lénárt Lillának a közleményírás kapcsán felmerülő problémák közös megoldásáért, Bernáth Máriának a sejtenyésztés során nyújtott segítségéért.

Köszönöm a Lendület Kutatócsoport minden tagjának: Hosszú Ádámnak, Bánki Nóra Fanninak, Antal Zsuzsának, Balogh Dórának, Szkibiszkij Edgárnak, hogy a csapat részese lehettem.

Végül köszönöm családomnak, hogy kutatómunkám során háttérrel biztosítottak számomra.