

A podocita károsodás molekuláris mechanizmusainak vizsgálata diabéteszben

Doktori értekezés

Pappné Dr. Fang Lilla

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kökény Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Haris Ágnes, Ph.D., főorvos
Dr. Reismann Péter, Ph.D., egyetemi tanársegéd

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Fekete Andrea, Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Vörös Péter, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	7
1.1	Diabéteszes nefropátia	7
1.1.1	Epidemiológia.....	7
1.1.2	Klinikai lefolyás	9
1.1.2.1	I. típusú diabéteszhez társuló nefropátia.....	9
1.1.2.2	II. típusú diabéteszhez társuló nefropátia	10
1.1.3	Diabéteszes nefropátia patológiája	11
1.1.4	Podociták szerepe diabéteszes nefropátiában	12
1.1.4.1	Podociták és a glomeruláris filtrációs barrier	12
1.1.4.2	A podociták feladata.....	14
1.1.4.3	A podociták károsodása proteinuriához vezet	15
1.1.4.4	Podocitaszám csökkenés diabéteszes nefropátiában	16
1.1.5	Terápiás lehetőségek diabéteszes nefropátiában	16
1.1.5.1	Vércukor kontroll diabéteszben.....	17
1.1.5.2	Antihipertenzív terápia	17
1.1.5.3	Renin-angiotenzin rendszer	18
1.1.5.4	Dohányzás szerepe	20
1.1.5.5	További terápiás stratégiák.....	20
1.1.5.6	Egyéb gátlószerek.....	22
1.2	Foszfodiészterázgátlók	22
1.2.1	Miért merülhet fel a foszfodiészterázgátlók alkalmazása a diabéteszes nefropátia kezelésében?.....	22
1.2.2	A főbb ciklikus nukleotidok szerepe	23
1.2.3	Nitrogén monoxid - ciklikus guanozin monofoszfát tengely a vesében.....	24
1.2.4	A foszfodiészteráz rendszer.....	25
1.2.5	PDE5.....	25
1.3	A SCAI fehérje szerepe diabéteszes nefropátiában	28
1.3.1	A TGF- β és a Wnt/ β -katenin útvonal diabéteszben.....	28
1.3.2	β 1-integrin szerepe a glomerulus ép strukturájának fenntartásában.....	30
1.3.3	Miofibroblasztok eredete és működése vesefibrózisban	32

1.3.4	Kapcsolat a SCAI és az α -SMA között	33
2	CÉLKITŰZÉSEK	36
3	MÓDSZEREK	37
3.1	Állatok	37
3.2	Diabétesz indukció patkányokban	37
3.3	A patkányok kísérleti csoportjai és kezelési protokoll	37
3.4	Diabétesz indukció egerekben	38
3.5	Vérnyomásmérés patkányokban, vér- és vizeletvizsgálat	38
3.6	Vese szövettan és immunhisztokémia	39
3.7	Glomeruloszklerózis index	39
3.8	Tubulointersticiális károsodás mértéke	39
3.9	Immunhisztokémia lépései	40
3.10	Western-blot	41
3.11	Kvantitatív RT-PCR (qPCR)	43
3.12	Egér podocita sejtvonal vizsgálata	44
3.13	Statisztikák.....	45
4	EREDMÉNYEK.....	46
4.1	<i>A ciklikus GMP szint emelése szelektív foszfodiészteráz-5 gátlóval csökkentette a podocita károsodás mértékét diabéteszes patkányban</i>	<i>46</i>
4.1.1	Vardenafil kezelés hatására megemelkedett a szérum cGMP szint diabéteszes állatokban.....	46
4.1.2	A vardenafil kezelés nem befolyásolta a metabolikus paramétereiket, a vesehipertófiát és a vérnyomást.....	46
4.1.3	Diabéteszes állatokban vardenafil kezelés hatására csökkent a proteinuria, a glomeruláris remodelling, a fibronectin és a TGF- β ₁ expresszió	48
4.1.4	Vardenafil kezelés hatására helyreállt a podociták cGMP tartalma és csökkent a podocita károsodás mértéke.....	53
4.1.5	A vardenafil kezelés nem befolyásolta az oxidatív stressz markereit diabéteszes patkányokban.....	57
4.2	<i>SCAI expresszió vizsgálata diabéteszes nefropátiában</i>	<i>59</i>
4.2.1	Diabéteszes nefropátia patkánymodellben szignifikánsan csökkent a SCAI fehérje expresszió a tubulusokban.....	59

4.2.2	Diabéteszes egerek teljes veséjében csökken a SCAI mRNS expressziója....	61
4.2.3	Hiperglikémia hatására fokozódik a podociták SCAI mRNS expressziója in vitro.....	62
5	MEGBESZÉLÉS	64
6	KÖVETKEZTETÉSEK.....	70
7	ÖSSZEFOGLALÁS	71
8	SUMMARY	72
9	IRODALOMJEGYZÉK	73
10	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	93
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	94

Rövidítések jegyzéke

AII	angiotenzin II.
ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
ACR	albumin/kreatinin hányados (albumin to creatinine ratio)
ADVANCE	Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron MR Controlled Evaluation
AVOID	Aliskiren in the Evaluation of Proteinuria in Diabetes
AGE	glikozilált végtermék (advanced glycation end product)
ARB	angiotenzin receptor blokkoló (angiotensin receptor blocker)
cAMP	ciklikus adenozin monofoszfát
cGMP	ciklikus guanozin monofoszfát
CKD	krónikus vesebetegség (ckronic kidney disease)
CTGF	kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor)
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
DM	diabétesz mellitusz
DN	diabéteszes nefropátia
ECM	extracelluláris mátrix
EDIC	Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications
EMT	epiteliális mezenchimális átalakulás (epithelial to mesenchymal transition)
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintáz
EPHESUS	Eplerenone in Patients with Heart Failure Due to Systolic Dysfunction Complicating Acute Myocardial Infarction
ESRD	végállapotú veseelégtelenség (end stage kidney disease)
GAPDH	glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GBM	glomerulus bazális membrán
GC	guanilát cikláz
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
GSI	glomeruloszklerózis index
Hb	hemoglobin
MAP	átlagos artériás vérnyomás (mean arterial blood pressure)

MRTF	miokardinszerű transzkripció faktor (myocardin related transcription factor)
NO	nitrogén monoxid
PAS	perjódsav Schiff (periodic acid Schiff)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDE	foszfodiészteráz
PDGF	vérlemezke irányított növekedési faktor (platelet derived growth factor)
PKC	protein kináz C
PKG	cGMP dependens protein kináz G
RAGE	glikozilált végtermékek receptora (receptor for advanced glycation end products)
RAS	renin-angiotenzin rendszer
RhoA	Ras homolog gene family member A
RPF	renális plazma áramlás (renal plasma flow)
SCAI	rákos sejtek invázióját szuprimáló molekula (suppressor of cancer cell invasion)
SMA	alfa-simaizom aktin
Smad	a Drosophila MAD (mothers against decapentaplegic) és a Caenorhabditis elegans SMA (small body size) fehérjéinek homológja a humán Smad fehérje, a név a kettő összevonásából jött
SRF	szérum válasz faktor (serum response factor)
STZ	streptozotocin
T1DM	I. típusú diabétesz mellitusz
T2DM	II. típusú diabétesz mellitusz
TGF- β 1	transzformáló növekedési faktor-béta 1 (transforming growth factor-beta 1)
TSP-1	trombospondin-1
UAER	vizelet albumin exkréciós ráta (urinary albumin excretion ratio)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

1 Bevezetés

A glomerulusban található vizcerális epiteliális sejtek, vagyis a podociták fontos szerepet játszanak a glomeruláris filtrációs barrier szerkezetének és funkciójának megtartásában. Humán és kísérleti modelleken végzett vizsgálatok demonstrálják, hogy a podocita sejtek megfogyatkozása egyike a diabéteszes vesében legkorábban kialakuló sejtkárosodásnak (1-3). A podociták morfológiai változása mellett a csökkent glomeruláris podocitaszám fontos előrejelzője a diabéteszes nefropátia progressziójának, miszerint minél kevesebb a podocita, annál gyorsabb a progresszió (1,4). Ezen megfigyelések a podocita károsodást a diabéteszes nefropátia egyik korai indikátoraként azonosítják, azonban a podocita károsodás molekuláris mechanizmusai nem teljesen ismertek.

1.1 Diabéteszes nefropátia

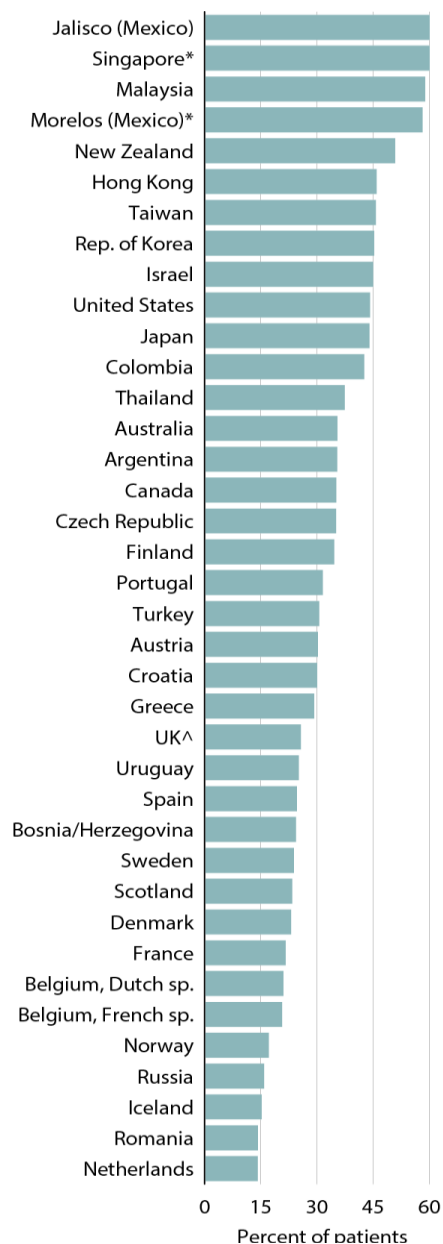
1.1.1 Epidemiológia

A diabétesz mellitusz (DM) előfordulása az egész világon nő, és a jelenlegi trendek szerint hamarosan a legfontosabb haláloki tényezővé válik. A 2010-es Egészségügyi Közlöny adatai szerint a 20-69 év közötti magyar populációban a DM gyakorisága 7,47%-ra becsülhető. A magasabb életkorú lakosság körében a 2-es típusú DM (2TDM) prevalenciája elérheti a 15-20%-ot (5).

A diabétesz mellitusz növekvő gyakoriságával együtt exponenciálisan gyarapszik a diabéteszes nefropátia (DN) incidenciája. A II. típusú, nem-inzulin-dependens diabéteszes betegek alkotják a legnagyobb és leggyorsabban növekvő vesepótló kezelést igénylő csoportot (6,7).

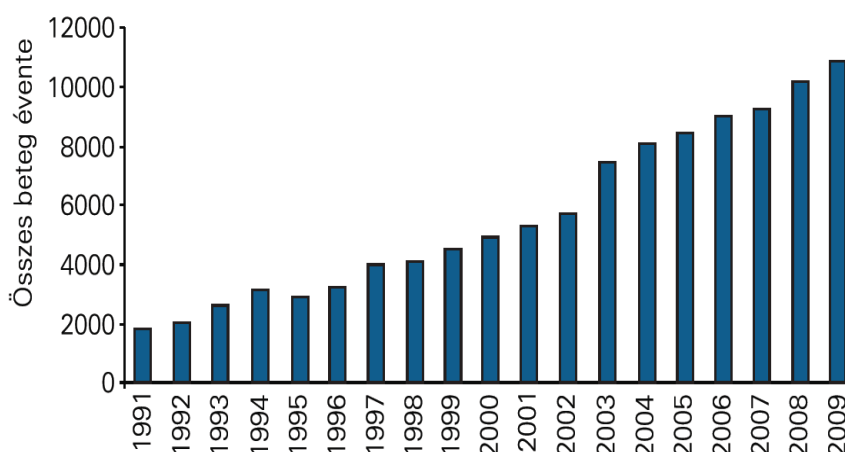
Nemzetközi statisztikai össze-hasonlítások alapján 2009-ben és 2010-ben az esetek 51-63%-ában diabétesz mellitusz volt az újonnan kialakult végstádiumú veseelégtelenség elsődleges kiváltó oka Mexikóban, Szingapúrban, Malajziában és Új-Zélandon. Több, mint az esetek 40%-ban volt felelős a diabétesz végstádiumú veseelégtelenség kialakulásában az Egyesült Államokban, Hong Kongban, Taiwanon, Koreában, Izraelben, Japánban és Kolumbiában. Húsz százalék alatti az arány Norvégiában, Oroszországban, Romániában és Hollandiában (8) (1. ábra).

Magyarországon a végstádiumú veseelégtelenség előfordulása átlagosan 6-7%-kal növekszik évente (9). Amikor a krónikus vesebetegség (CKD) progressziója végállapotú veseelégtelenségbe torkollik, a betegeknek vesepótló kezelésre van szükségük, ami dialízist vagy transzplantációt jelent. Szomorú jelenség, hogy világszerte és hazánkban is feltartóztathatatlanul növekszik a dialízisre szoruló betegek száma (2. ábra). Amellett, hogy a rendszeres hemodialízis kezelés jelentős életminőség változással, valamint fokozott kardiovaszkuláris morbiditási és mortalitási kockázattal jár, számottevően megugranak a terápia során felmerülő költségek is. Egy 2008-as felmérés szerint, attól függően, hogy milyen lehetőségek adóttak a betegellátás során, a dialízis megkezdésének első hónapjában 14500 - 29000 amerikai dollárba (3,5 – 6 millió forint) kerül egyetlen beteg kezelése (10).



1. ábra Diabétesz mellitusz miatti végstádiumú veseelégtelenség incidenciája százalékosan az összes végstádiumú veseelégtelenség incidenciájához képest.

(Forrás: United States Renal Data System, 2012 (www.usrds.org))



2. ábra. Dializált betegek számának alakulása Magyarországon 1991-2009 között (Forrás: Kulcsár et al. Dialízis kezelés Magyarországon: 2003-2009, *Hypertonia és Nephrologia*, 2010;14(5))

1.1.2 Klinikai lefolyás

A diabéteszes nefropátia olyan klinikai tünetegyüttes, amelynek egyik jellemzője a tartósan fennálló albuminuria, amit legalább két alkalommal mértek 3-6 hónap eltéréssel. A betegséghez rendszerint társul magasvérnyomás, súlyosbodó proteinuria és a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) progresszív hanyatlása (11).

1.1.2.1 I. típusú diabéteszhez társuló nefropátia

Mogensen szerint öt stádiumot különítünk el az I. típusú diabétesz mellituszhoz (T1DM) társuló nefropátia progressziójában (12). Az I. stádiumot a vese hipertrófiája és hiperfiltráció jellemzi, amelyek az I. típusú cukorbetegség diagnosztizálásakor már fennállnak. A cukorbetegség kezdete után rövidesen átlagosan 15%-kal nő meg a vesék tömege, ezzel párhuzamosan növekszik a vesék fehérje- és RNS tartalma és a DNS szintézis. Megjelenik a mikroalbuminuria és fokozódik a vizelet albumin exkréciós ráta (UAER), a GFR és a vese plazma áramlás (RPF) (11). A II. stádium klinikailag „néma”. A GFR továbbra is emelkedett (hiperfiltráció), a vizelet albumin és a vérnyomás normális. Ebben a fázisban korai szöveti elváltozások jelennek meg: a bazális membrán nem-specifikus megvastagodása észlelhető és a mezangiális mátrix néhol kiszélesedik

(13). A hiperfiltráció mértéke 14 mmol/l szérumban glükózsztig arányos a hiperglikémia súlyosságával. E szint fölött a GFR csökkenni kezd. A III. stádium a mikroalbuminuria és a kezdődő nefropátia állomása. A GFR lehet normális vagy emelkedett, az UAER megemelkedik. A mikroalbuminuria kialakulásához enyhe, de észrevehető vérnyomás emelkedés társul. Progrediálnak a szöveti elváltozások: a bazális membrán tovább vastagszik, a mezangium kiszélesedése a glomeruluson belül tovább csökkenti a filtrációs felületet. Ahogy vastagodik a glomeruláris bazális membrán és nő az intersticiális térfogat, ezzel arányosan csökken a GFR (14). A IV. stádiumban a nefropátia manifesztálódik. A szöveti elváltozások egyértelműen megfigyelhetők és a legtöbb betegnek magas a vérnyomása. A proteinuria mértéke exponenciálisan nő, a GFR pedig folyamatosan és visszafordíthatatlanul csökken. A GFR csökkenése erősen korrelál a vérnyomás emelkedésével. Az V. stádium a végállapotú veseelégtelenség stádiuma. A vesefunkció progresszív beszűkülésével párhuzamosan, a fibrózis következtében a vesék fokozatosan, szimmetrikusan zsugorodnak (15).

1.1.2.2 II. típusú diabéteszhez társuló nefropátia

A II. típusú diabétesz mellituszhoz (T2DM) társuló nefropátia patomechanizmusa sok hasonlóságot mutat a T1DM-ben előforduló nefropátiával. Az újonnan diagnosztizált II. típusú cukorbetegnek több, mint harmadánál emelkedett a GFR (16), függetlenül a vérnyomástól, a vércukorkontrolltól és a szérumban lipid szintektől. Az effektív RPF nem nagyobb, így a filtrációs frakció (GFR/RPF) emelkedett II. típusú cukorbetegknél (13). Az emelkedett filtrációs frakció magában foglalja a kapilláris nyomás növekedését (glomeruláris hipertenzió), ami feltételezhetően egy fontos tényező a diabéteszes nefropátia kialakulásában és progressziójában (17). A hatékony kezelés és a szoros vércukor kontroll hozzájárul a GFR normalizálásához.

Az T1DM-hoz hasonlóan, a GFR stabil marad a mikroalbuminuria kialakulásáig, vagy akár még mikroalbuminuria mellett is, ameddig magasvérnyomás vagy perzisztáló proteinuria nem alakul ki. Manifeszt nefropátiában a GFR csökkenésének a mértéke ingadozóbb, mint T1DM-ben, mert T2DM-ben inkább egyénre specifikus, emellett korrelál a vérnyomás értékekkel is (18).

Figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy a T2DM legtöbbször későbbi életkorban alakul ki, mint a T1DM. A T2DM miatt kialakult hiperglikémia mellett az életkor előrehaladtával a vesében zajló természetes öregedés, vagy egyéb társbetegségek nagyobb kialakulásának valószínűsége (mint például elhízás, artériás hipertenzió, diszlipidémia, dohányzás), mind negatívan befolyásolják a vesék állapotát. Ezért lehetséges, hogy idősebb betegeknél a T2DM fellépése mellett gyakran aszpecifikus, vaszkuláris és tubulo-intersticiális elváltozásokat észlelünk makroalbuminuriával, hosszú ideje fennálló artériás hipertóniával és korai veseelégtelenséggel (19).

1.1.3 Diabéteszes nefropátia patológiája

Az esetlegesen eltérő kórelőzmények és etiológia ellenére a diabéteszes nefropátia osztályozásánál a T1DM és T2DM egy csoportba kerül, mert jelentős átfedés van közöttük a szövettani elváltozások és renális szövődmények tekintetében (20).

A diabéteszes nefropátia (DN) patológiájában négy osztályt különítünk el (21):

- I. osztály: Glomeruláris bazálmembrán megvastagodás nőknél >395nm, férfiaknál >430nm 9 évnél idősebb betegek esetén (csak elektronmikroszkópos felvételen észlelhető).
- II/A. osztály: Enyhe mezangiális kiszélesedés: extracelluláris mátrix felhalmozódása a mezangiumban, amely nem nagyobb mértékű, mint egy kapilláris lumen keresztmetszete, illetve a glomerulus területének kevesebb, mint 25%-a érintett.
- II/B. osztály: Súlyos mezangiális kiszélesedés, nagyobb mértékű, mint egy kapilláris lumen keresztmetszete, de itt is csak a glomerulus területének kevesebb, mint 25%-a érintett.
- III osztály: Noduláris szklerózis (Kimmelstiel-Wilson lézió), kevesebb, mint a glomerulusok 50%-a esetén. A Kimmelstiel-Wilson lézió a glomerulusban egy fokális, kerek vagy ovális, sejtmentes, hialin-tartalmú, mezangiális massa.
- IV osztály: Globális glomeruloszklerózis a glomerulusok több, mint 50%-ban a glomerulusban az extracelluláris mátrix fehérjék (kollagén I, III, IV; fibronectin) rendkívül nagymértékben felhalmozódnak.

A glomeruláris elváltozásokon kívül kialakulhatnak arterioláris léziók, ahogy a hialin progresszíven átveszi az egész érfalstruktúra helyét az afferens és efferens szakaszon egyaránt. Míg az afferens arteriola hialinizációja diabéteszen kívül más

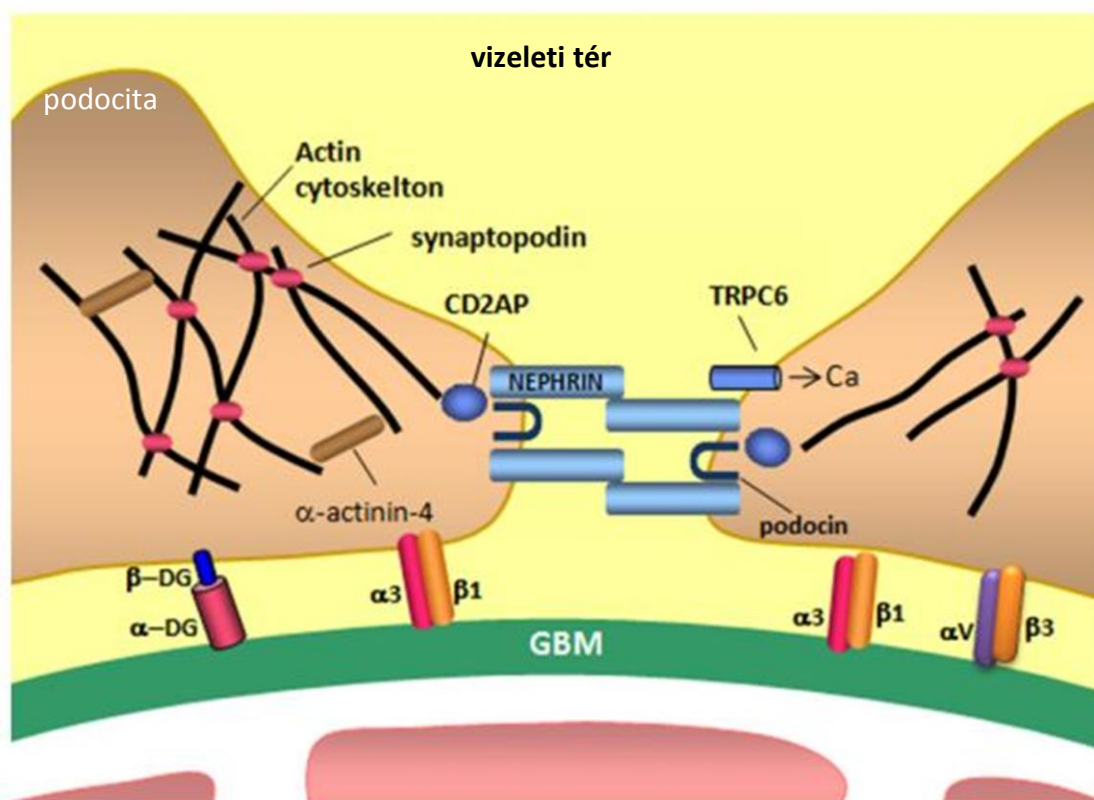
állapotokban is előfordul, mint például magasvérnyomás betegségben, addig az efferens arteriola érintettsége kifejezetten diabéteszre specifikus (22).

A tubulusok és az interstícium változatos, nem-specifikus elváltozásokat mutathat. Gyakori lelet a tubulussejtek vakuolizációja és a kollagén felhalmozódás az interstíciumban (23). A hiperglikémia következtében kialakuló Armani-Ebstein léziók jellemzően a tubulussejtek patológiás duzzadtságával járnak, a sejtek elvesztik eredeti alakjukat, a citoplazma feltisztult, és a citoplazmában glikogén halmozódik fel (24).

1.1.4 Podociták szerepe diabéteszes nefropátiában

1.1.4.1 Podociták és a glomeruláris filtrációs barrier

A podociták magas fokon specializált, terminálisan differenciált epitél sejtek a vese glomerulusokban. A podociták a glomeruláris kapilláris hurok külső részén ülnek, egész pontosan a kapillárist borító glomeruláris bazálmembrán (GBM) illetve a vizeleti tér közt nyúlnak el. A podociták hosszú lábnyúlványokat terjesztenek ki a GBM felé, amelyhez sejtfelszíni adhéziós fehérjékkel, integrinek (főként $\alpha3\beta1$) és α - valamint β -disztroglikán segítségével kötődnek (25,26) (3. ábra.) A podocita lábnyúlványok citoszkeletonja elsősorban aktin filamentumokból épül fel, illetve a hozzá-asszociált fehérjékből, mint például miozin, alfa-aktinin-4 és vinkulin, amelyek alkalmassá teszik a podocitát a GBM-hez kötődéshez (27). A szomszédos podociták lábnyúlványai interdigitálnak egymással, és a közöttük lévő vékony sejtközötti tér egy 30-40 nm-es porózus membránszerű egyedülálló szerkezet, amit rés-diafragmának hívnak (28). A rés-diafragma egyik meghatározó alkotója a nefrin, amely egy transzmembrán fehérje. Az egymás melletti nefrin molekulák nagy extracelluláris részei cipzárszerű alakzatban kapcsolódnak egymáshoz (29). A podocin, az intracelluláris CD2AP (CD-2-asszociált protein), a vimentin és dezmin hálózatok horgonyozzák ki a rés-diafragmát az aktin citoszkeletonhoz (30) (31). Ezen fehérjék kölcsönhatásai felelnek a glomeruláris filtráció szerkezeti és funkcionális integritásáért.



3. ábra A podocita lábnyúlványok és a rés-diafragma. A podocita lábnyúlvány aktin-citoszkeletonból épül fel, a glomeruláris bazálmembránhoz $\alpha_3\beta_1$ -integrin és α - és β -disztroglikán segítségével kapcsolódik. A lábnyúlványok közötti rés-diafragma fő alkotója a nefrin, cipzárszerű alakzatot hoz létre a két sejt között, és podocin és CD2AP segítségével rögzül a citoszkeletonhoz.

(Forrás doi:10.1053/j.ajkd.2011.03.033.)

A podocita lábnyúlványok közötti rés-diafragma, a GBM és az arteriolák fenesztrált endotélsejtei képezik a glomeruláris filtrációs barriert, amely a víz- és elektrolit filtrációt biztosítja, de megakadályozza a nagyobb fehérjék átjárását, az albuminvesztést. A glomeruláris arteriola belső felszínének 20-50%-a fenesztrált, azonban ezek a pórusok jóval nagyobbak, mint az albumin. Tehát elsősorban, mint átteresztő, és nem pedig szűrőként funkcionál. Az endotéliumot borító glikokalix képes lehet az albumin és más plazma proteinek kiszűrésére, és így része a glomeruláris filtrációs barriernak (32). A glomeruláris bazálmembrán egy sejtmentes mátrix, amelyhez a podociták és az endotél sejtek hozzá tudnak tapadni. A GBM fő alkotói (kollagén IV, laminin és proteoglikánok) főként a kapilláris szerkezeti megtartását

segítik, de a laminin valószínűleg fontos alkotója a filtrációs barriernek. Végül a podocita lábnyúlványok közötti rés-diafragma képezi a filtrációs barrier utolsó, és egyben az egyik legfontosabb elemét (33).

1.1.4.2 A podociták feladata

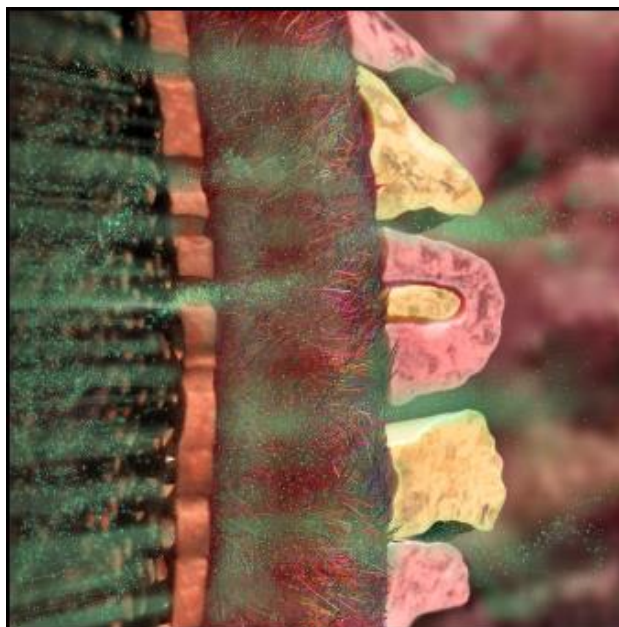
A podocita sérülés következményeit jobban megérthetjük a podociták működésének feltérképezésével:

1. Glomeruláris filtrációs barrier: A podociták a GBM-mel és a fenesztrált kapilláris endotélsejtekkel együtt képezik a glomeruláris filtrációs barrieret, amely elválasztja egymástól a kapillárisokban folyó vért és a filtrált folyadékot a Bowman-tokban, illetve a vizet és elektrolitokat átereszt, míg az albumin nagy részét és más plazma fehérjéket visszatartja (34).
2. A glomeruláris kapilláris gomolyag szerkezeti stabilitása: A podociták aktin citoskeletonja a simaizomsejtek kontraktilis képességére emlékeztető működéssel ruházza fel a podocitákat, amely segítséget nyújt a kapillárisokban uralkodó hidrosztatikai nyomás ellentartásához, ami itt kb. 60 Hgmm, nagyobb mint máshol a szervezetben (35).
3. A GBM szintézise és javítása: A GBM-et képező kollagén $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ hálózatot a podociták termelik (36).
4. Interakció más glomeruláris sejtekkel: citokinek, növekedési faktorok termelésével a podociták hatnak más sejtekre. Például a podociták által termelt VEGF a filtrációval ellenirányba átjut a GBM-en és a kapilláris endotél sejteket segíti az egészséges fenesztráció fenntartásában. A podociták termelte PDGF pedig a mezangiális sejtekre hat (37).
5. Immunológiai szerep: A podociták részt vesznek a Bowman-tokban megjelenő patogének és abnormális fehérjék kiszűrésében. A podociták Toll-like 4 receptorokat expresszálnak, amely patogén jelre kemokin-képződést indukál. A Gram negatív baktériumok sejtfalának lipopoliszacharid komponense B7-1 képzésre serkenti a podocitát, amely egyrészt aktiválja a T sejteket, másrészt elindítja a podociták aktin-citoskeleton és a rés-diafragma átrendeződését, hozzájárulva a proteinuria kialakulásához (38).

1.1.4.3 A podociták károsodása proteinuriához vezet

A podocita sérülés klasszikus klinikai tünete a proteinuria, vagyis nagyobb mennyiségű fehérje ürítése a vizelettel. A glomerulus más sejtjeinek sérülése, mint például az endotél sejtek (de a mezangiális sejtekről is ezt állítják), amelyek közvetlen kontaktusban vannak a vérrel (fehérvérsejt, komplement és lobfehérjék tartalma miatt), glomeruláris gyulladáshoz vezetnek. Ezzel szemben a podociták a kapillárisokon kívül helyezkednek el, sérülésük nem

vezet fehérvérsejtek toborzásához, gyulladáshoz, hanem inkább a glomeruláris filtrációs barrier károsodáshoz, és ezáltal proteinuriához. A podociták funkcionális károsodása bekövetkezhet a rés-diafragmát alkotó fehérjék integritásának megromlásából vagy a podocita alakjának vagy töltésének megváltozása miatt. A podociták aktív folyamat révén képesek a lábnyúlványaikat a kiterjesztett állapotból visszavonni, eltüntetni, az aktin citoskeleton újraátrendezése által (35). A rés-diafragma sérülése miatt így az albumin szabadon átjut a vizeleti térbe.



4. ábra A glomeruláris filtrációs barrier sérül
diabéteszben. Balról jobbra látható a fenesztrált kapilláris endotél, a glomeruláris bazálmembrán és a podocita lábnyúlványok. (Forrás: *The Visual MD*

http://www.thevisualmd.com/media_gallery_slice.php?idu=11019&idc=991)

1.1.4.4 Podocitaszám csökkenés diabéteszes nefropátiában

Mind T1DM és T2DM esetén kimutatták, hogy a glomerulusokban jelentősen megfogyatkozik a podociták száma (4,39). A podocitákról alkotott általános nézet szerint - lévén terminálisan differenciált sejtek - nem tudnak regenerálódni, ennek következtében a podocitaszám csökkenése tartósan módosítja a filtrációs barrier működését. A podocitaszám csökkenhet egyrészt amiatt, hogy a podociták leválnak a GBM-ről és a vizeleti térbe kerülnek (40,41), másrészt a podociták apoptózisa miatt. Suszták és mksai. kimutatták, hogy hiperglikémia hatására a podocitákban apoptózis indul, illetve T1DM és T2DM egérmodellben egyaránt megfigyelték, hogy a hiperglikémia hatására beinduló podocita apoptózis megelőzi a vizeletbe történő albumin kiválasztást és a mezangiális mátrix expansziót (3). A podocitaszám csökkenése tehát a diabéteszes nefropátia egy korai jelzője. A podociták leválásának mértéke a GBM-ről korrelál a T1DM-mel járó proteinuria, csökkent vesefunkció és nefropátia súlyosságával (42).

A hiperglikémia nem csak közvetlenül károsítja a podocitákat, de közvetetten a növekvő oxidatív stressz és glikozilált végtermékek, protein kináz C és a renin-angiotenzin rendszer aktiválásával, valamint növekedési faktorok, mint TGF- β és VEGF termelése által is.

1.1.5 *Terápiás lehetőségek diabéteszes nefropátiában*

A diabéteszes nefropátia korai fázisainak kialakulását a következő négy alapvető beavatkozással lehet késleltetni:

- közel normoglikémia beállítása
- vérnyomás csökkentése
- renin-angiotenzin rendszer gátlása
- dohányzás felhagyása (11).

A hatékonyabb DN prevenció és kezelés érdekében jelenleg is folynak kutatások egyéb terápiás megközelítésekkel.

1.1.5.1 Vércukor kontroll diabéteszben

A HbA_{1C} szint korrelál az albuminuria mértékével. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy megfelelő vércukor kontroll lassítja a mikroalbuminuria progresszióját mind T1DM-ben és T2DM-ben (43). A DCCT (Diabetes Control and Complication Trial) vizsgálatban az intenzifikált vércukor kontroll a hagyományos terápiával szemben szignifikánsan jobban csökkentette a mikroalbuminuria kialakulásának kockázatát (44). Súlyosabb vesebetegség esetén azonban a vércukor szint nem egyértelműen befolyásolja a nefropátia progresszióját. Az ACCORD, az ADVANCE és más, T2DM-es beteg bevonásával történt vizsgálatok szerint az intenzív glukóz kontroll nem javítja a nefropátia progresszióját T2DM-ben (45). A DCCT folytatása, az EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications) tanulmány továbbra is arra a kérdésre keresi a választ, hogy rossz metabolikus kontroll után helyreállított glukóz kontroll mellett miért progrediálnak diabéteszben a vese és egyéb szövődmények, vagyis a „metabolikus emlékezet” jelenségét kutatja (46).

1.1.5.2 Antihipertenzív terápia

A mikroalbuminuria kialakulása után rendszerint 2-5 évvel magasvérnyomás betegség társul a diabéteszhez. Jelenleg úgy tűnik, hogy a szisztémás hipertenzió folyamatos kontrollálása a legfontosabb beavatkozási módszer a proteinuria mérséklésében és a veseelégtelenség progressziójának lassításában mindkét típusú cukorbetegség esetén (47). A hatodik Joint National Committee, az egyik legfőbb amerikai hipertenzológus társaság irányelve szerint a diabéteszes betegek 130/85 Hgmm-t meghaladó vérnyomását erőteljes antihipertenzív terápiával kell csökkenteni, a proteinuriás betegek célvérnyomásértéke pedig 125/75 Hgmm legyen (48). A legutóbbi ADVANCE tanulmányban a vizsgálatban résztvevő alanyok egy csoportjánál a vérnyomást jóval a jelenleg ajánlott érték alatt állították be, és az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a vérnyomáscsökkentő kezelés elindításának nincs egyértelmű küszöbszintje T2DM-ben. Szintén az ADVANCE tanulmányban figyelték meg, hogy a betegek esetleges vérnyomásától függetlenül adagolt fix dózisú angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) inhibitor, perindopril és tiazid diuretikum, indapamid kombinációs

kezelés jótékony hatású volt (49). A fix kombinált terápia láthatólag mérsékelte a mikrovaszkuláris eseményeket, 21%-kal kevesebb esetben lépett fel mikroalbuminuria, ami fontos bizonyítékul szolgál arra, hogy ez a kezelési stratégia lassítja vagy akár megelőzi a még előrehaladottabb vesebetegség kialakulását. A kedvező vesehatások a teljes és kardiovaszkuláris betegségprogresszió csökkenéssel összefüggésben adódtak. Egyelőre azonban nem tisztázott, hogy ezen specifikus gyógyszerkombináció vagy egyszerűen a vérnyomás csökkentése okozta-e a nyilvánvaló pozitív kardiovaszkuláris és renális eredményeket (50).

1.1.5.3 Renin-angiotenzin rendszer

Habár diabéteszben a vérnyomáscsökkentés önmagában vesevédő hatású, a renin-angiotenzin rendszer (RAS) gátlása ezen felül is szolgálhat előnyökkel. Az angiotenzin II (AII) a RAS fő effektor molekulája. Vazokonstriktor hatását leginkább a posztglomeruláris arteriolákon fejt ki, így növeli a glomeruláris hidrosztatikus nyomást és a plazma fehérjék ultrafiltrációját. Ezek olyan hatások, amelyek közrejátszhatnak a krónikus vesekárosodás kialakulásában és progressziójában. Ezen túlmenően az AII elősegíti a sejtproliferációt, a gyulladást és a fibrózist, amelyek fokozzák a vesekárosodást (51). Humán és kísérleti adatok egyaránt fokozott intrarenális RAS működést mutatnak diabéteszben. Érdekes, hogy metabolikus stimulusok, mint pl. magas vércukorszint és az AGE fokozza a mezangiális sejtek angiotenzin II termelését (52). Végző soron így a cukorbetegségre jellemző metabolikus milió, az angiotenzin II hatásai révén, fontos mediátora a diabéteszes vesekárosodásnak (53).

A legtöbb tanulmány szerint az ACE-gátlók 40-50%-kal képesek mérsékelni bármilyen etiológiájú proteinuriát. Diabéteszes nefropátia terápiajában ezért elsőként választandó a RAS rendszer gátlása ACE gátlóval vagy angiotenzin receptor blokkolóval (ARB, angiotensin receptor blocker) a proteinuria és a progresszió lassítása érdekében (54). Azonban még mindig tisztázatlan, hogy a vesevédő mechanizmus mennyire független a vérnyomáscsökkentő hatástól.

1.1.5.3.1 Angiotenzin-konvertáló enzimgátlók és angiotenzin receptor blokkolók

Az elmúlt évtizedben az a hipotézis merült fel, hogy ACE-gátló és ARB együttesen, mint „kettős bloká” még teljesebb RAS gátlást biztosíthat, és a

monoterápiával szemben hatékonyabb lehet a proteinuria és vérnyomás csökkentésében. Azonban a legtöbb klinikai vizsgálat, beleértve a jelenleg folyó nagy tanulmányokat és meta-analíziseket, nem számolt be semmilyen előnyösebb végkifejletről, sőt felmerült a vesefunkcióra vonatkozó kedvezőtlen hatás is. Emiatt egyesek szerint az ACE-gátló és ARB kombináció mellőzendő a klinikumban, a most zajló vizsgálatok ezzel kapcsolatos eredményeinek megjelenéséig (55).

1.1.5.3.2 Nagyon magas dózisu angiotenzin-konvertáló enzimgátló vagy angiotenzin receptor blokkolók

Egy másik népszerű stratégia a klinikai indikáció szerint ajánlottánál jóval nagyobb dózisu RAS-gátló szerek alkalmazása. Hollenberg és mk. egy kisebb tanulmányában 391 T2DM-es, hipertóniás és albuminuriás beteg kapott 640 mg/nap valsartan kezelést. Hat hónapos kezelési idő után a magas és a normál dózist (160 mg/nap valsartan) kapó csoportok összehasonlítása szerint az albuminuria jobban csökkent a magas dózisu kezelés hatására, a vérnyomástól függetlenül. Ezen eredmények alapján előnyben részesíthetők a magas dózisu monoterápiák (esetleg diuretikummal kiegészítve) a kettős blokáddal szemben (53).

1.1.5.3.3 Aldoszteron antagonisták

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer gátlás további lehetséges módja az aldoszteron antagonistá kezelés. Az aldoszteron gyulladást, fibrózist és nekrozist indukál a szívben és a vesében. A mineralokortikoid receptor antagonistá spironolakton több kisebb tanulmányban hatásosnak bizonyult a diabéteszes nefropátia kezelésében. Egy specifikusabb mineralokortikoid antagonistá, az eplerenon (amelynek a spironolaktonnal szemben nincs anti-androgén mellékhatása) az EPHEBUS tanulmányban kardioprotektívnek bizonyult (56). Preklinikai vizsgálat során Fekete és mksai. az aldoszteron antagonistá monoterápiát hasonlónak vagy még hatékonyabbnak találták, mint az ACE-gátló vagy ARB kezelést a streptozotcinnal indukált diabéteszes nefropátiában, patkányban (57).

1.1.5.3.4 Reningátlók

A reningátlók, mint az aliskiren megjelenése egy új alternatív stratégiát jelent a RAS gátlásban, akár diabéteszben is. Az AVOID (Aliskiren in the Evaluation of

Proteinuria in Diabetes) tanulmány eredményei szerint az aliskiren-losartan kombináció csökkenti a proteinuriát, különösen elhanyagolt vércukor kontroll esetén (58). Az ALTITUDE (Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints) tanulmány azt vizsgálta, hogy aliskiren kiegészítés a sztenderd ACE gátló vagy ARB mellé csökkenti-e a mortalitást és a nefropátia progresszióját T2DM-ben. Azonban a tanulmányt felfüggesztették, mivel az aliskiren kiegészítést kapó betegek csoportjában megnőtt az agyi infarktus, vesefunkció hanyatlás, hipotenzió és a hiperkalémia incidenciája (59).

1.1.5.4 Dohányzás szerepe

Több, mint két évtizede ismert, hogy a dohányzás fokozza a diabéteszes nefropátia kialakulásának a kockázatát mind T1DM-ben, mind T2DM-ben. Másfélszer akkora a GFR hanyatlása a dohányosoknál, mint a nem-dohányzóknál, vagy az ex-dohányosoknál. Ez a különbség igazolja, hogy miért fontos a dohányzás elhagyására biztatni a cukorbetegeket (60,61).

1.1.5.5 További terápiás stratégiák

Mivel a RAS blokád és a szoros vércukor kontroll nem tudja a diabéteszes nefropátiát megelőzni vagy visszafordítani, számos alternatív startégia is felmerült, amelyek jelenleg preklinikai vagy klinikai tesztelés korai fázisaiban vannak.

1.1.5.5.1 Csökkent fehérje bevitel

Az urémiás tünetek mérséklése mellett a fehérje megszorítások több, kis létszámú cukorbetegyet bevonó kísérlet szerint csökkentik a vesefunkció károsodás progresszióját (62).

1.1.5.5.2 Lipid szintek csökkentése

A lipidcsökkentő kezelés is fontos szerepet játszhat a vesevédelemben diabéteszes betegeknél. Több tanulmány is utalt rá, hogy a koleszterin szintézis kulcsenzimét, a hidroximetil-glutaril koenzim-A (HMG-CoA) reduktázt gátló kezelés megakadályozza a kezdődő és manifeszt DN progresszióját, de ezek az eredmények még nem általánosíthatóak (63).

1.1.5.5.3 AGE felhalmozódást csökkentő szerek

A vesevédelem nem csupán a vérnyomás- és vércukorkontrollon alapszik, azonban feltétlenül összefüggésbe hozható az AGE képződés és az oxidatív stressz csökkentésével. Noha ez sem elégséges kitétel, mivel az inzulinkezelés amellet, hogy csökkenti az AGE képződést és az oxidatív stresszt, mégsem renoprotektív, valószínűleg az állandó hiperinzulinémia és a TGF- β túltermelődés miatt (64). Az AGE képződés gátlása vagy degradációjuk serkentése érdekében számos gyógyszer terveztek. Az egyik első AGE képződést gátló szer, az aminoguanidin alkalmazása diabéteszes állatmodellekben csökkentette az AGE lerakódást, a mezangiális márix kiszélesedését és az albuminuriát, azonban a szérum kreatinin megduplázódását nem tudta késleltetni, illetve lupusszerű tüneteket váltott ki (53). Az angiotenzin receptor blokkolók közvetlenül csökkentik az AGE képződést, más vegyületek, mint a kobalt pedig közvetetten. Vizsgálat alatt áll az alagebrium, amely eddig reménnyel teli eredményeket hozott az albuminuria és a renális strukturális károsodások visszatartásával diabéteszes állatmodellekben. Miyata és mk. által újonnan kifejlesztett TM2002 is igen kedvező mechanizmusú AGE inhibitornak tűnik, mely a vérnyomás változtatása nélkül csökkenti az AGE szintet és az oxidatív stresszt (64).

1.1.5.5.4 Protein kináz C gátlás

Hiperglikémia következtében fokozódik a PKC aktivitás, amely számos olyan sejten belüli folyamatot mediál, amelyek részt vesznek a progresszív vese és érbetegségek kialakulásában. A különböző PKC izoformák közül a PKC α és a PKC β tűnik leginkább relevánsnak nefropátiában, így az új terápiás stratégiák ezeket az izoformákat célozzák meg. Ruboxistaurin, szelektív PKC β inhibitor rövidebb (1 év) követéses klinikai vizsgálatban csökkentette az albuminuriát, a vizelet TGF- β szint nem nőtt és tendenciájában a vesefunkció romlását is lassította. Egy hosszabb (3 éves) követéses vizsgálat során azonban, ahol elsősorban a retinopátiában kifejtett jótékony hatását vizsgálták, nem találtak eltérő eredményeket a ruboxistaurin és a placebo csoport között a renális paraméterek tekintetében (65).

1.1.5.5 Sulodexid

A sulodexid egy glukozaminoglikán molekula, amiről azt feltételezik, hogy a glomerulusokban az ionháztartás fenntartását segíti elő és emellett csökkenti a diabéteszes vesében a sejtproliferációt és a fibrózist. Diabétesz modellben igazolták a sulodexid endotélium protektív hatását, így segíthet a kardiovaszkuláris szövődmények csökkentésében. Renoprotektív hatását még vizsgálják (66).

1.1.5.6 Egyéb gátlók

Az endotelin receptor gátlás, az érdiszfunkció csökkentése révén, új támadási pont a DN kezelésében (67).

A magas vércukorszint aktiválja a RhoA/Rho-kinázokat a mezangiális sejtekben, ami indukálja a fibronectin expressziót. Az Rho kináz útvonal gátlása vesevédő hatású kísérleti DN-ben (68).

Új lehetőség a hiszton deacetyláz inhibitorok alkalmazása is. E gátlók klinikai alkalmazását jelenleg tumor ellenes hatásuk miatt tesztelik. Ezeknek a szereknek diabéteszes vesében antifibrotikus és renoprotektív hatása van, ami felveti az alkalmazásuk lehetőségét DN-ben (69).

Kutatásunk során munkacsoportunkkal szintén a DN lehetséges terápiájának egy új megközelítését, a foszfodiészteráz gátlók renális hatását vizsgáltuk.

1.2 Foszfodiészterázgátlók

1.2.1 *Miért merülhet fel a foszfodiészterázgátlók alkalmazása a diabéteszes nefropátia kezelésében?*

A diabéteszben fokozódó intraglomeruláris nyomás (70) és ennek következtében kialakuló glomeruláris hipertenzió (71) csökkentése a ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) – nitrogén monoxid (NO) tengely befolyásolása révén is lehetséges. NO hatására a vese erei dilatálnak, beleértve az afferens arteriolákat is (72). Az NO hatását az intracellulárisan termelődő cGMP közvetíti, amely az erek simaizom-relaxációját váltja ki (73,74). Foszfodiészteráz-5 (PDE5) enzim bontja a cGMP-t, PDE5 gátlókkal

pedig a vaszkuláris cGMP-NO útvonal serkenthető (75). A PDE5 gátlók (szildenafilfil, tadalafil, vardenafil) a cGMP szint emelkedését teszik lehetővé, és elsősorban erektilis diszfunkció kezelésére használják, minthogy a pénisz ereinek elernyedését elősegítve a barlangos test könnyebben telítődik (76) (77). A PDE5 enzim kimutatható a vesében is (78). Nefropátiában fokozódik a foszfodiészterázok aktivitása, ennek következtében lecsökken a cGMP mennyisége, és így közvetve csökken az NO hatása is. Foszfodiészterázgátlókkal a cGMP szint normalizálható. A megnövekedett cGMP szint feltehetőleg fokozza az NO hatást, és emiatt a glomeruloszklerózis kialakulása lelassul (79). Ezen az elgondoláson alapszik számos kutatás napjainkban, amelyek a PDE inhibitorok működését vizsgálják a különböző nefropátiákban. Vesefibrózist modellező, unilaterális uréter obstrukció egérkísérlet során a sildenafilfil fibrózist csökkentő hatását írták le (80). Újabban pedig kimutatták PDE5 gátló kezelés jótékony hatását a potocita motilitás károsodás kezelésében (81). Diabéteszes nefropátiában még kevés adat áll rendelkezésre a foszfodiészterázok aktivitására vonatkozóan (82), de azok eredménye, illetve más nefropátiákban (83,84) való jótékony hatása alapján a foszfodiészterázgátló kezelés diabéteszes nefropátiában is létjogosultságot kaphat.

1.2.2 A főbb ciklikus nukleotidok szerepe

A ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) és a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) sejten belüli másodlagos hírvivő molekulák, amelyek részt vesznek fontos vesefunkciós folyamatokban, mint például az intracelluláris transzport, az értónus szabályozása, a parenchimasejtek proliferációja és a gyulladás (85). közreműködik Az általuk szabályozott számos jelátviteli folyamat szerepet játszik a vesebetegségek kialakulásában, elősegítve a mitogenezist, gyulladást és extracelluláris mátrix felhalmozódását (83,86). Az intracelluláris cAMP és cGMP tartalom és biológiai hatékonyság elsősorban a szintézisük és lebontásuk egyensúlyától függ. A szintézisüket adenilát illetve guanilát cikláz enzimek végzik, a lebontásukat pedig ciklikus-3',5'-nukleotid foszfodiészterázok (PDE). A PDE-ek a ciklikus nukleotidok 3'-foszfoészter kötését hidrolizálják, amelynek eredménye egy-egy biológialag inaktív nem-ciklikus 5'-AMP és 5'-GMP lesz. A ciklikus nukleotidok szintézisének kapacitása tízed akkora, mint a PDE-k hidrolízisének a kapacitása. A PDE-k így szabályozzák a ciklikus nukleotidok hatásainak időtartamát (78).

1.2.3 Nitrogén monoxid - ciklikus guanozin monofoszfát tengely a vesében

Az NO-cGMP szabályozó tengely egyensúlyát az NO képződés határozza meg annak függvényében, hogy mekkora a biológiai felhasználhatósága és milyen a cGMP katabolizmus mértéke. Az NO endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) közreműködésével szintetizálódik az ér endotél sejtjeiben L-argininből. Passzívan átdiffundál az ér membránján és a célsejtek guanilát cikláz (GC) enzimét aktiválja. A keletkező cGMP komplex útvonalat aktivál, és kifejti a sejtre specifikus hatásokat (87). A cGMP a sejten belüli folyamatokat úgy szabályozza, hogy hozzáköt a PDE-k allosztérikus kötőhelyekhez és a cGMP-dependens-protein-kinázhoz (PKG). Az aktivált PKG elsődleges modulátorként szolgál az értónus, a sejt túlélés, az endoteliális permeabilitás, érhomeosztázis és -proliferáció szabályozásában (88), illetve bizonyos PDE-t (pl. PDE5) foszforilál, ezáltal aktiválja azt (89). A cGMP ezen kívül ioncsatornákra is hat. Lecsökkenti az intracelluláris kalcium ion koncentrációt, a miozin foszfatáz aktivitását serkenti, ennek következtében a kalcium ion iránti érzékenység lecsökken. A rövid távú következmény a simaizomsejt relaxáció (vazodilatáció). Hosszabb távú válaszok is kialakulnak. Az egyik az, hogy az állandó guanilát cikláz stimuláció serkenti a PDE-k expresszióját, ami csökkent cGMP hatékonysághoz vezet. Ez a legfőbb oka az NO-felszabadító szerekkel szembeni toleranciának. Emberi sejtekben a cGMP indukálja a PDE1C-t; ami a simaizomproliferációt serkenti. További NO hatás a vaszkuláris leukocita toborzás és a trombózisképződés gátlása (90,91).

A nitrogén monoxid (NO) – ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) tengely egyensúlyi működése elengedhetetlen a vese perfúzió és a glomeruláris filtráció élettani működéséhez (92). Diabéteszes nefropátiában az NO-cGMP rendszer homeosztázisa több ponton károsodik: az oxidatív stressz miatt elégtelenné válik az eNOS működése (93); az NO-t reaktív oxigén gyökök (ROS) hatástalanítják (94), a megvastagodott endotheliális bazális membránon keresztül csökken az NO penetráló képessége (95). Továbbá a cGMP degradáció felgyorsul, amint az oxidált sGC funkciózavara miatt csökken a cGMP szintézis (96), illetve a cGMP-t katabolizáló PDE-k aktivitása megnő (78) Végeredményben lecsökken az NO-függő cGMP hatás (97).

1.2.4 *A foszfodiészteráz rendszer*

A sejtekben expresszáldó különböző cikláz és PDE enzimek széles palettája ad magyarázatot a ciklikus nukleotidok változatos működésére. Emlősökben 10 különböző adenilát cikláz gént és körülbelül 20 különböző PDE gént azonosítottak, változó szabályozással, élettani jellemzőkkel. Egy emberi sejt 1-2 fajta cikláz expresszáld és 3-4 féle PDE-t, a lehetséges kombinációk száma nagyon nagy. Jelenleg 11 PDE géncsaládot ismerünk (98). A PDE enzimekre két fontos régió jellemző. A C-terminális részen helyezkedik el az erősen konzervatív katalitikus régió. A PDE-k katalitikus doménjeinek szekvenciája 30%-ban homológ (99). Az N-terminális részen a szabályozó domének helyezkednek el. Ez a régió erősen változékony. Katalitikus doménjeik hasonlósága miatt tehát a PDE-k ugyanazokat a reakciókat katalizálják, különbözőségük a szabályozás módjában rejlik (100).

1.2.5 *PDE5*

A foszfodiészteráz-5 enzim szubtrát molekulája a cGMP, sőt a PDE5 a legfőbb cGMP-t hidrolizáló foszfodiészteráz. A PDE5-nek három izoformája ismert, A1, A2 és A3. Ezek az izoformák csak az N-terminális szabályozó doménjeikben különböznek egymástól. Az A3 forma simaizomsejt specifikus, a másik kettő nem mutat sejtspecificitást (101).

A PDE5 sokféle szövetből izolálható, például megtalálható a barlangos testekben (102), vérlemezkékben, tüdőben, simaizomsejtekben (103-105), agyban (106), vesében (107), hüvelyi szövetekben (108), lépben, endotél sejtekben (109), idegrendszeri Purkinje-sejtekben (110), kisagyban, retinában, timuszban, szívben, májban, nyelőcsőben, gyomorban, hasnyálmirigyben, vékonybélben, vastagbélben, a proszatatában és a húgycsőben (99).

A glomerulusok a foszfodiészterázok közül PDE5-ben bővelkednek leginkább (111). A megnövekedett PDE5 aktivitáshoz kötött NO elégtelenség szerepe számos vesebetegségben bizonyított (79).

A PDE5 inhibitorokat világszerte alkalmazzák erektilis diszfunkció kezelésére. Ezen hatóanyagokat újabban vesebetegségek kísérleti modelljeiben is tesztelik, például indukált nátrium retenció intravénás sildenafil kezeléssel patkányban (83,112); transzplantáció utáni meleg-ischaemiás vesék kezelése szintén sildenafillel malacokban

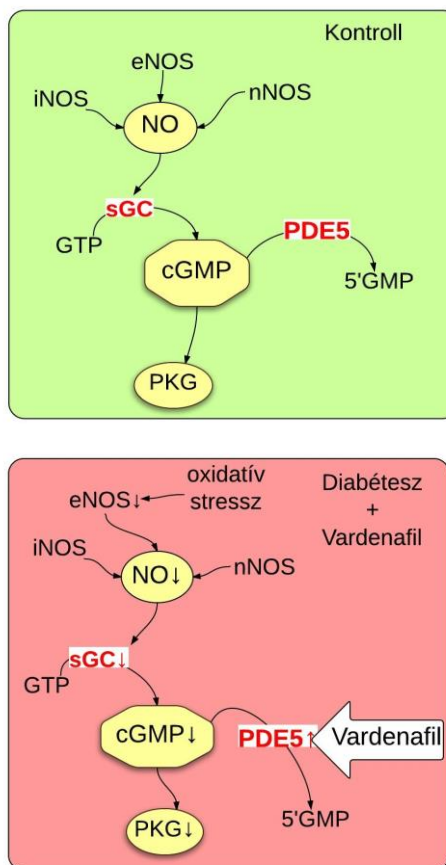
(84). Kuno és mtsai. hatékonyan találta a sildenafil kezelést II. típusú diabéteszes nefropátiában, patkányokban (113). Lau és mtsai. I. típusú diabéteszes nyulak nefropátiáját vizsgálva kimutatta, hogy a vardenafil kezelés szignifikánsan javította a cukorbeteg állatok vesefunkcióját (82). PDE5 inhibitorok hatásáról diabéteszben egyre több kutatás szól (114), a molekuláris mechanizmusról azonban egyelőre kevés információ áll rendelkezésünkre.

Kutatásunk tárgya a PDE5 inhibitor vardenafil hatásának jellemzése streptozotocin-indukált cukorbeteg patkány modell nefropátiájának progressziójában. Ahogy a korábbi tanulmányok eredményei alapján várható volt, a modellünkben a vardenafil kezelés megőrizte a vesefunkciót, emelte a vese cGMP tartalmát. Ezzel összhangban, csökkentette a profibrotikus faktorok expresszióját és megelőzte a glomeruloszklerózist. Ezek alapján felvetődik a PDE5 inhibitorok klinikai alkalmazhatóságának lehetősége a DN megelőzésében, ill. kezelésében.

5. ábra: Vardenafil hipotézis.

Fent: Az NO-cGMP tengely fiziológias állapotban. Az NO szintéziséért a háromféle –endotheliális, neuronális és indukálható- NOS enzim felelős. Az NO aktiválja az sGC-t, mely a GTP-t cGMP-vé alakítja. A cGMP hozzáköt a PKG-hoz, amely az értónus és érhomeosztázis szabályozásában elsődleges modulátor. A cGMP katabolizmusát a PDE5 végzi.

Lent: Diabétesz hatására károsodik az NO-cGMP tengely. A csökkent NO expresszió egyik oka, hogy az oxidatív stressz miatt elégtelen az eNOS működése. A csökkent NO mellett, az oxidált sGC funkciójavara és a fokozott PDE5 aktivitás közrejátszik a károsodott cGMP szintézisben. Végül a csökkent cGMP miatt a PKG nem látja el biológiai funkcióját. Hipotézisünkben vardenafil kezelésre, mely a PDE5 szelektív gátlószere, a cGMP szintje normalizálódhat, és képes végrehajtani a szerepét a vese fiziológias működéséért.



1.3 A SCAI fehérje szerepe diabéteszes nefropátiában

1.3.1 A TGF- β és a Wnt/ β -katenin útvonal diabéteszben

A TGF- β /Smad jelátviteli útvonal egy jól ismert profibrotikus útvonal, mely kulcsszerepet játszik a DN patogenezisében. A TGF- β /Smad jelátviteli útvonal mellett más útvonalak is hozzájárulnak a DN progressziójához, mint például a PI3K/Akt, p38 MAPK, JAK/STAT és Wnt/ β -katenin (115) (116). Annak ellenére, hogy ezek az útvonalak és molekulák összefüggésbe hozhatók a DN patogenezisével, még mindig nincs teljes mértékben feltérképezve a DN patomechanizmusa, és a kezelés megnyugtató megoldása még előttünk áll. Eképp a DN kutatásokban sok figyelmet kap újabb jelátviteli útvonalak megismerése is. A SCAI molekula – rákos sejtek invázióját szuprimáló molekula (suppressor of cancer cell invasion)- egy újonnan azonosított transzkripciós kofaktor, amelynek szabályozása kulcsfontosságúnak ígérkezik a rákos megbetegedésekben (117,118). Chen és mtsai. a SCAI és a Wnt/ β -katenin útvonal szoros kapcsolatát írta le a glióma patogenezisében, illetve a SCAI expresszió befolyásolásával a glióma progressziója is arányosan változik (118). A biztató eredmények felvetik a kérdést, hogy ha a SCAI és Wnt/ β -katenin útvonal egymással összefügg, a DN patomechanizmusában miként alakul ennek az újonnan leírt, ígéretes SCAI molekulának a működése.

Diabéteszes nefropátiában aktiválódik a Wnt (a név egy *Drosophilában* leírt mutációból származik: „wingless”= szárny nélküli) jelátviteli útvonal (119). A Wnt jelátviteli útvonal többféle élettani folyamatban játszik fontos szerepet, így a sejtproliferáció, a sejt-differenciáció, őssejt fenntartás, angiogenezis, gyulladás, fibrózis, és karcinogenezis (120). A Wnt útvonal aktiválásának első lépése, hogy a Wnt ligandok extracellulárisan egy receptorkomplexhez kötődnek, amelynek fő komponense a frizzled (FZD) receptor és az alacsony-denzitású-lipoprotein-receptorhoz kötődő protein 5 vagy 6 (LRP5 vagy LRP6). Az LRP5 vagy az LRP6 ezután intracellulárisan továbbítja a jelet, melynek eredményeként inaktiválódik a glikogén szintáz kináz 3 β (GSK3 β), axin és adenomatózus polipózis fehérje (APC) alkotta „destruktív komplex”. Az inaktivált destruktív komplex ezután nem serkenti a β -katenin degradációját, így a β -katenin a sejtmagba juthat és a Wnt gén-célpontjainak – mint például a ciklinD1 mellett, a VEGF és CTGF- átírását szabályozhatja (121). Zhou

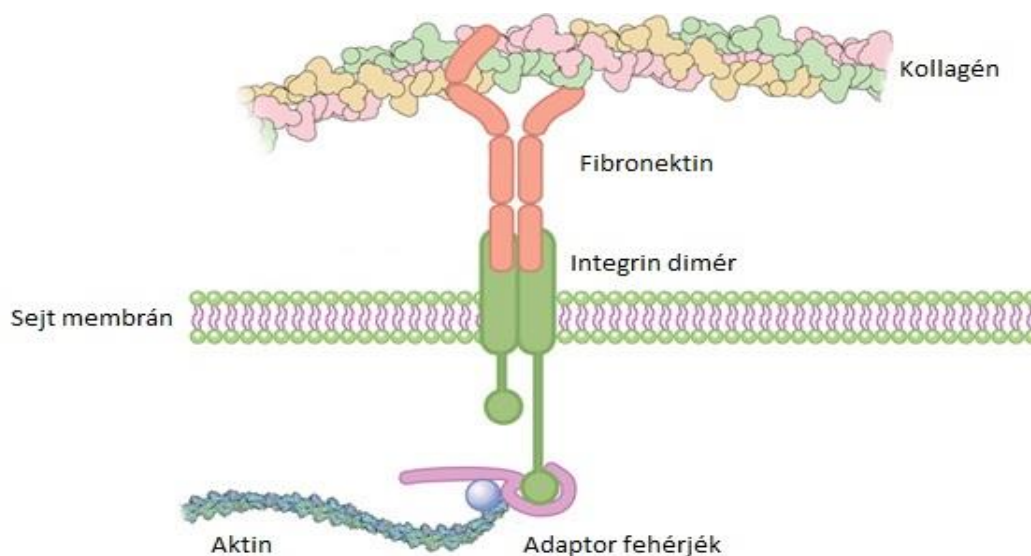
és mtsai. megfigyelték, hogy a rákos folyamatokban túlműködő Wnt jelátviteli útvonal 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben szintén túlműködik (119). A magas vércukorszint és az oxidatív stressz közvetlen kiváltó szerepet játszik a Wnt jelátvitel aktivációjában. Továbbá a Wnt/ β -katenin jelátvitel gátlása LRP6 elleni antitesttel javította a diabéteszes nefropátia progresszióját.

Brandt és mtsai. 2009-ben írták le –a korábban hipotetikus- SCAI fehérjét, amely az invazív sejtmigráció szabályozásában játszik szerepet (117). A SCAI erősen konzervált szerkezetet és széleskörű szöveti megoszlást mutat a gerinceseknél. SCAI hiányában extrém mértékben nő a β 1-integrin gén expressziója, amely egy adhéziós sejtfelszíni receptor. Az integrinek hatására fokozódik az aktin felhalmozódás, közvetlenül aktiválják az aktin polimerizációt, illetve az aktin citoskeletonhoz kötik az extracelluláris mátrixot (122,123). Az α -simaizom-aktin (α -SMA), az aktin hatféle izoformája közül az egyik, a fibrózisban jelentős szerepet játszó miofibroblasztok legjellemzőbb markere. Vesében az α -SMA intersticiális upregulációja aktiválja a miofibrolasztokat, mindez pedig korrelál az intersticiális fibrózis mértékével (124). A Wnt/ β -katenin jelátvitel ugyancsak érintett a mezangiális sejtek epitheliális-mezenchimális átalakulásának (EMT) folyamatában, diabéteszben (116). A TGF- β fontos közvetítő molekula a magas vércukorszint okozta EMT kialakulásában, melyben a mikroRNS-ek (miR) is szerepet játszanak. A miR-ek rövid, körülbelül 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, melyek a velük részlegesen komplementer szekvenciájú mRNS-hez kapcsolódva a célmolekulák lebontását eredményezik, így gátolva az expressziót. A miR-215 célpontja a β -katenin-közvetítő-fehérje-1 (CTNNBIP1). Diabéteszben a fokozott miR-215 expresszió gátolja a CTNNBIP1-et, és aktiválja Wnt/ β -katenin útvonalat, amelynek következtében fokozódik a TGF- β közvetítette EMT a mezangiális sejtekben és megnövekszik a fibronectin és az α -SMA expresszió (125). Az integrinek expressziója és az α -SMA-pozitív miofibroblasztok száma megnövekszik és döntő szerepet játszik a vesefibrózis patomechanizmusában, azonban a feltételezhetően mindezt felülről (upstream) befolyásoló SCAI expressziójának alakulását vesefibrózisban még nem vizsgálták eddig.

1.3.2 β 1-integrin szerepe a glomerulus ép szerkezetének fenntartásában

SCAI hiányában extrém mértékben nő a β 1-integrin expressziója. Az integrinek azonban nemcsak a rákos sejtmigráció fontos szereplői, hanem a podociták β 1-integrin expressziójának kritikus jelentősége van a glomerulus szerkezetének fenntartásában (126).

Az integrinek szerepét leginkább olyan sejtfolyamatokban írták le, mint a sejt adhézió, sejt vándorlás, és növekedési folyamatok (127). Az integrinek transzmembrán receptorok, extracellulárisan a fokális adhézió helyén kerülnek kölcsönhatásba a kollagénnel. Intracellulárisan pedig számos aktin-kötő fehérjéhez kapcsolódnak, mint az α -aktinin, talin, vinkulin, és kötik ezeket az aktin-citoszkeletonhoz.



6. ábra Az integrinek kötik össze az ECM-et az aktin citoskeletonnal. A transzmembrán integrin receptor extracelluláris oldalán fibronektin segítségével köt hozzá az ECM-et alkotó kollagénnel. A fibronektinek az ECM glikoproteinjei. Az integrin intracelluláris oldalán pedig sejtvezetkezőket köt, adaptor fehérjéken keresztül (vinkulin, talin, α -aktinin) kapcsolódik az aktin sejtvezetkezőhöz, létrehozva a fokális adhézióknak nevezett sejt-kapcsoló szerkezetét. Ezen komplexnek fontos szerepe van a glomerulus integritásának, illetve a podociták morfológiájának és működésének fenntartásában. (Forrás: <http://www.nature.com/scitable/content/integrin-connects-the-extracellular-matrix-with-the-14707425>)

Az integrinek kapcsolata a citoskeletonnal többféleképpen létrejöhet. Az integrin először hozzáköt a talinhoz, amely utána hozzáköt a vinkulinhoz, ez az α -

aktininhoz, az α -aktinin végül az aktin-citoszkeletonhoz (128) (129) (130). Így az integrin három fehérjén keresztül kötődik az aktinhoz. Emellett a talin közvetlenül is tud kötődni az aktinhoz, tehát képes létrehozni kapcsolatot az integrin és az aktin között a másik két fehérje nélkül (131). Hasonlóképp, az α -aktinin is képes a $\beta 1$ -integrinhez közvetlenül kötődni (132) (6. ábra).

Az integrinek heterodimer szerkezetű receptorok, két alegységből épülnek fel: egy α és egy β alegységből. A szerevezetben legbőségesebben expresszálandó alegység, a $\beta 1$ - integrin, legalább 12-féle α alegységgel tud heterodimert képezni, amelyek a sejt-sejt kölcsönhatások létrehozásában vesznek részt az extracelluláris mátrix (ECM) alkotóival. Az $\alpha 3, \beta 1$ - és $\alpha 6, \beta 1$ -integrin jelentős laminin-kötő receptor, míg az $\alpha 1, \beta 1$ - és $\alpha 2, \beta 1$ -integrinek predomináns kollagén-kötő receptorok (133). Ezen integrinek több szervrendszerben előfordulnak, köztük a vesében is, ahol mind a tubulusok, mind a glomerulusok egyaránt expresszálják (133).

A podocita lábnyúlvány aktin-citoszkeletonból épül fel, a glomeruláris bazálmembránhoz $\alpha 3, \beta 1$ -integrin segítségével kapcsolódik. Az $\alpha 3, \beta 1$ -integrinről kimutatták, hogy fontos szerepet játszik glomerulusok fejlődésében *in vivo*. Az egerek elpusztulnak $\alpha 3$ alegység hiányában még a neonatális időszakban, jellemző kép a glomeruláris kapilláris hurkok abnormális fejlődése, dezorganizált GBM és podocita lábnyúlvány (134). Specifikusan podocitákban hiányzó $\alpha 3$ alegység masszív proteinuria és nefrózis szindróma kialakulásához vezetett az egerek 5-6 hetes korára. A hathetes egerek veséjében szklerotizált glomerulusok, dezorganizálódott GBM, a tubulusokban hialin volt látható fénymikroszkóppal. Elektron-mikroszkóppal a podocita lábnyúlványok leválása volt megfigyelhető (135). Specifikusan a $\beta 1$ alegység törlése podocitákban még előrehaladottabb glomerulus degenerációhoz vezetett, mint az $\alpha 3$ alegység törlése. Az egerek 3-5 hetes korára veseelégtelenség alakult ki a nagymértékű podocita veszteség miatt (126).

A podociták csökkent $\alpha 3, \beta 1$ -integrin expresszióját kimutatták számos humán és patkány diabétesz modellben (136) (137). Továbbá humán és patkány podocytá sejt kultúrában is csökkent $\alpha 3, \beta 1$ -integrin expressziót mutattak ki hiperglikémiás körülmények között (138). A podociták csökkent $\alpha 3, \beta 1$ -integrin expresszióját szoros összefüggésbe hozzák a podociták GBM-ről történő leszakadásával, amelyek aztán a vizeletbe kerülnek (139).

1.3.3 *Miofibroblasztok eredete és működése vesefibrózisban*

A miofibroblasztok a simaizomsejtekhez hasonló, kontraktilis sejtek, amelyek jellemzően α -SMA-t expresszálnak (140). A miofibroblasztok a legfőbb kollagén-képző sejtek különböző kóros állapotokban, mint a sebgyógyulás, a fibrózis és a rák (141,142). A miofibroblasztok működése azonban változatosan alakul a betegségek progressziója során. Sebgyógyuláskor, amikor a szövetek helyreállítása befejeződött, a miofibroblasztok is eltűnnek (141). Fibrózis esetén a miofibroblasztok folyamatosan jelen vannak, folyamatos az extracelluláris mátrix akkumuláció, mígnem a működő parenchima helyét elfoglalva a folyamat szervi elégtelenségéhez vezet. Jelenleg a fibrózisra nincs specifikus gyógymód. A miofibroblaszt működés jobb megértése segíthet a hatékony, célzott terápiák megtalálásában.

A miofibroblasztok fiziológias állapotban, endogén módon nem fordulnak elő a szövetekben, hanem fibrózishoz vezető folyamatok során differenciálódnak más sejtekből. A miofibroblasztokat fejlődéstanilag mezodermális eredetűeknek tekintjük, azonban a fibrózis során megjelenő miofibroblasztokat többfelől eredeztetik a különböző kutatások.

1. Rezidens fibroblasztokból származó miofibroblasztok
2. Vaszkuláris pericita-eredetű miofibroblasztok
3. Epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) eredetű miofibroblasztok
4. Endotheliális-mezenchimális tranzíció (EndMT) eredetű miofibroblasztok
5. Csontvelő eredetű miofibroblasztok(143)

A periciták, elhelyezkedésüket tekintve, a kapilláris endothélt ölelik körül, részlegesen a bazális membránba ágyazódnak. A vesében a periciták nyúlványai hidat képezhetnek a tubuláris epithél sejtekkel, így általuk kétirányú jelátviteli folyamatok jönnek létre a kapilláris endothél és a tubuláris epithél között. Vesekárosodás esetén a periciták azonos módon leválnak a kapillárisok faláról és az intersticiális térbe vándorolnak. Ott a periciták aktiválódás után heg-képző miofibroblasztokká differenciálódnak. A peritubuláris kapillárisok destabilizálódnak periciták hiányában, és ez vaszkuláris regresszióhoz vezet. Eképp szorosan összefügg a vesekárosodás során bekövetkező vesefibrózis és kapilláris ártalom (144).

Az EndMT kutatásának az a megfigyelés szolgált kiindulópontjával, hogy egyre több tanulmány talált szoros összefüggést a diabéteszben kialakuló mikroalbuminuria és az endotheliális diszfunkció között. Li és mtsai. endotheliális sejtvonalat követhető egereken végzett kísérletében kimutatta, hogy 1 hónappal a diabétesz fellépése után a kapillárisok endothél sejtjeiből miofibroblasztok differenciálódtak (145).

EMT során a tubulussejtek eleresztik az egymás közti sejt-sejt kontaktust, elveszítik epithél jellegüket és az epitheliális sejtekre jellemző markereket, és de novo mezenchimális markereket kezdenek el expresszálni. Egy vesefibrózist modellező transzgenikus egereken végzett kutatás az EMT egyértelmű fontosságát mutatta ki, amelyben a miofibroblasztok közel 40%-a származott epithél sejtekből (146,147).

Csontvelő eredetű sejtek hozzájárulnak a vesekárosodást követő regenerációhoz. Gyulladásos jelekre csontvelő eredetű sejtek vándorolnak a vesébe, és renális tubulussejtek, mezangiális sejtek és endotheliális sejtek jellemző markereit kezdik expresszálni. A vesefibrózis során felszaporodó miofibroblasztok egy része kimutathatóan csontvelői eredetű. (148-150).

LeBleu és mtsai. kísérletükben azt írták le, hogy renális fibrózisban a rezidens fibroblasztokból származó miofibroblasztok az 50%-át teszik az összes miofibroblasztnak, és proliferáció révén jönnek létre. A maradék 50% nem-proliferáló, és csontvelő, EMT és EndMT eredetű 35-10-5% arányban. A vaszkuláris pericita eredetű miofibroblasztokat elhanyagolható mértékűnek találták vesefibrózisban (151) Ezzel ellentétben Humphreys és mtsai. kísérletükkel kétségbe vonták az EMT szerepét a miofibroblaszt képződésben, és a pericita eredetű differenciációt találták a legjelentősebbnek vesefibrózis során (152). Vitatott eredetük ellenére a miofibroblasztok kulcsfontosságú szerepet játszanak a vesefibrózis kialakulásában.

Szöveti sérülés hatására a miofibroblasztok aktiválódnak és α -SMA-fehérjét tartalmazó stressz rostokat kezdenek termelni. A miofibroblasztok szekretálnak továbbá extracelluláris mátrix komponenseket, kollagént és mátrix metalloproteázokat, amelyek eredményeként a hegszövet kialakul (153).

1.3.4 Kapcsolat a SCAI és az α -SMA között

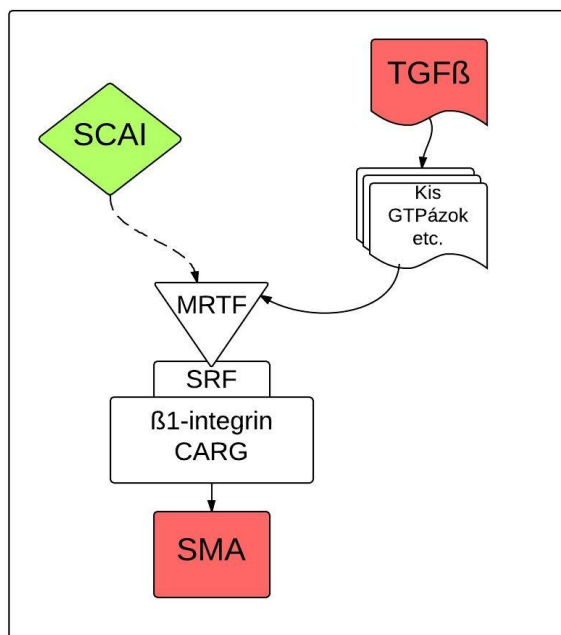
A miofibroblaszt képződés fő markere az újonnan meginduló α -SMA expresszió. Az α -SMA expresszió szabályozása rendkívül összetett, és számos jelátviteli lépést foglal magába.

A miofibroblasztok α -SMA expressziójának feltétele az aktivált szérumból származó faktor (serum response factor, SRF) reguláció. Az SRF elsődleges szerepet játszik majdnem minden simaizom-specifikus gén expressziójának szabályozásában. Az SRF

hozzákötődik a simaizom-specifikus gének [CC(A/T)6GG] szekvenciájához, mely régiót röviden CARG boxnak hívnak (154,155). Az SRF transzkripciós aktivitása megnövekszik, amikor miokardinszerű transzkripciós

faktorokhoz (myocardin-related transcription factor, MRTF) kötődik (156). Az MRTF-ek széleskörű eloszlást mutatnak a szervezetben, szabályozásuk szubcelluláris szinten történik az aktin citoszkeletonnal kölcsönhatásban. Az MRTF-ek rendelkeznek egy N-terminális RPEL-doménnel. Az RPEL-domén aktin kötésére szolgál, tehát az RPEL révén kötődik az MRTF a G-aktinhoz, másrészt és a

citoplazmából a sejtmagba szekvresztálódik. Szöveti stressz hatására aktiválódnak a TGF- β 1 és a kis GTPázok (RhoA, Rac1, Cdc42); megkezdődik az aktin citoszkeleton reorganizáció; és az MRTF-ek nukleáris transzlokációja, mely összeköti az aktin dinamikát az SRF-függő géntanszkripcióval. (157). Az aktivált kis GTPáz RhoA, Rac1 és Cdc42 és az utánuk következő (downstream) jelátviteli komponensek, a miozin könnyűlánc és a p38 foszforiláció (158-160) serkentik a miofibroblasztokban az ECM komponens és α -SMA kódoló gének transzkripcióját (158,161).



7. ábra. A SCAI szabályozásának feltételezett modellje az α -SMA expresszióban, vesefibrózis során. A TGF- β 1 jelátviteli útvonal aktiválódása stimulálja az MRTF kötődését az SRF-hez, mely komplexet alkot a β 1 integrin CARG-elemével és serkenti az α -SMA expressziót. A SCAI, hozzákötődve az MRTF-hez, gátolhatja ezt a folyamatot.

Brandt és mtsai. 2009-ben írták le a SCAI fehérjét, amely az MRTF-et gátolja, úgy hogy az MRTF-hez és az SRF-hez kötődik egy hármas komplexet képezve (117). A SCAI működésének feltérképezése még hiányos. Vesefibrózisban az α -SMA expresszáló miofibroblasztok fontos szerepet játszanak. Ha a SCAI gátolja az MRTF-et, és ezáltal az α -SMA expressziót, úgy feltételeztük, hogy olyan állapotokban, ahol magas α -SMA expressziót találunk (vesefibrózis), a SCAI expresszióknak alacsonynak kellene lennie (7. ábra). Ezt a hipotézist megvizsgálándó diabéteszes nefropátia modellben tanulmányoztuk a SCAI mRNS és fehérje expresszióját, valamint a szöveti lokalizációját. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a SCAI részt vesz a vesefibrózisban, a jelentős miofibroblaszt marker, α -SMA expresszió gátlása révén.

2 Célkitűzések

Jól ismert, hogy a diabéteszes nefropátia patogeneziséhez a vese csökkent NO termelése társul. A podocita károsodás molekuláris mechanizmusainak feltárása, és új típusú kezelési módszerek tesztelése érdekében kísérleteinket az alábbi célkitűzésekkel végeztük:

- Befolyásolható-e a I. típusú diabéteszes nefropátia progressziója patkányban az NO-cGMP útvonal farmakoterápiás támogatásával, vardenafillal?
- Milyen változásokat eredményez a vardenafil kezelés a diabéteszes vesében szöveti és molekuláris szinten?
- Hogyan alakul a podociták cGMP expressziója diabéteszben kezelés nélkül, illetve vardenafil kezelés hatására?

A diabéteszes nefropátia patomechanizmusának fontos szereplői továbbá az α -SMA-pozitív miofibroblasztok, amelyek aktiválódásában az MRTF-eknek jelentős szerepe van. A SCAI fehérjét az MRTF-ek gátlójaként a tumorsejt invázió fontos szereplőjének írták le. Kressner és mtsai. azon túlmenően, hogy tumor szuprimáló molekulaként írja le a SCAI-t, kísérleteikben a SCAI knock-out egerekben azt vizsgálják, hogy SCAI hiánya spontán tumorgenezist válthat ki (162). Diabéteszben, a tumorgenezishez hasonlóan központi fontosságú az extracelluláris mátrix felhalmozódás, ugyanakkor a SCAI expresszió alakulása eddig még nem ismert. Továbbá a SCAI széles körű szöveti eloszlása ellenére nem ismert a podociták SCAI expresszió mintázata.

Mindezek alapján további célunk volt annak vizsgálata,

- Hogyan alakul a SCAI expresszió diabéteszes vesében?
- Befolyásolja-e a hiperglikémia a podociták SCAI expresszióját in vitro?

3 Módszerek

3.1 Állatok

Kísérletünket fiatal, három hónapos hím Sprague-Dawley patkányokkal (250-300 gramm), valamint hím 8 hetes FVB/N egerekkel (25-30 gramm) végeztük (Charles River, Sulzfeld, Németország). Az állatházban biztosított volt számukra az állandó $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ hőmérséklet, 12 órás világosság/sötétség ciklusok, emellett hagyományos rágcsálótápot és ivóvizet kaptak, ad libitum. A kísérlet megfelelt a laboratóriumi állatok gondozásáról meghatározott, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* című amerikai szabványnak (US, National Institutes of Health NIH Publication No. 85-23, javított kiadás 1996). A helyi Állatkísérleti Etikai Bizottság felülvizsgálta, és jóváhagyta az összes beavatkozást és kezelést a kísérletet megelőzően.

3.2 Diabétesz indukció patkányokban

Az állatok szállítást követően egy hétig akklimatizálódtak. Ezután a patkányokban I. típusú diabétesz mellitust indukáltunk streptozotocin (STZ, 60mg/kg) egyszeri intraperitoneális injekciójával. Az STZ-t frissen oldottuk fel citrát pufferben (0,1 mol/L, pH 4.5), és feloldás után 15 percen belül beadtuk az állatoknak. A kontroll állatok tisztán pufferoldatot kaptak. Pontosan 72 órával később digitális vércukormérővel és tesztsíkokkal (Accu-Chek® Sensor, Roche Inc., Mannheim, Németország) meghatároztuk a vércukor értékeket. Azokat az állatokat, amelyeknek a vércukor értékei 15 mmol/l felettiéek voltak, diabéteszesnek tartottuk, és bevontuk a kísérletbe.

3.3 A patkányok kísérleti csoportjai és kezelési protokoll

A vardenafilos kísérletben a cukorbetegség indukció sikerének megállapítása után két csoportra osztottuk a diabéteszes patkányokat, az egyik lett a pozitív kontroll csoport (STZ, n=6), a másik pedig a vardenafil kezelést kapó csoport (STZ-Vardenafil, n=8). Azok a patkányok, amelyek csak citrát puffer injekciót kaptak, szolgálták egészséges kontroll csoportként (Kontroll, n=7; 7. ábra). A csoportbeosztás után 8 hétig kezeltük az állatokat, a nem-betegeket és a diabéteszes kontroll állatokat citrát puffer vivőanyaggal (0.01 mol/L), a másik diabéteszes csoportot per os szelektív

foszfodiészteráz-5 inhibitor vardenafillal (10 mg/kg/nap) ivóvízben feloldva. A napi folyadékfogyasztást rögzítettük és a vardenafil dózist folyamatosan hozzáigazítottuk.

A kísérlet végén ismét megmértük a testtömeget, ezzel együtt a vesetömeget is. A vese mintákat először folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80°C -on őriztük hűtőszekrényben.

A SCAI molekuláris szerepének vizsgálatához a patkányokat a diabétesz indukciót követően két csoportra osztottuk: Diabéteszes, $n=4$, és Kontroll, $n=4$. A Kontroll csoport állatai streptozotocin helyett csak citrát puffer injekciót kaptak.

3.4 Diabétesz indukció egerekben

Lévén még nem ismert a patkány SCAI mRNS szekvenciája, a renális SCAI génexpresszió vizsgálatához FVB/N egerekben ($n=10$) diabéteszt indukáltunk 8 hetes korban. Ehhez 5 napon keresztül naponta egyszeri intraperitoneális streptozotocin injekciót kaptak (STZ, 50 mg/kg/nap dózisban, pH 4,5 citrát pufferben frissen oldva /összdózis 250 mg/kg/). A kontroll egerek ($n=5$) csak citrát puffert kaptak. Egy hét múlva, négyórás éheztetés után, megmértük az éhgyomri vércukorszinteket Accu-Check tesztsíkkal és azokat az STZ-injektált egereket, akiknek az éhomi vércukor szintje kisebb volt, mint 20 mmol/l, kihagytuk a kísérletből ($n=3$). Az egereket 8 héttel a diabétesz indukció után feláldoztuk, és feldolgoztuk a veséjüket.

3.5 Vérnyomásmérés patkányokban, vér- és vizeletvizsgálat

A kezelési időszak leteltével intraperitoneális ketamin (100mg/kg) és xilazin (3mg/kg) adásával a patkányokat elaltattuk, és melegítő padra helyeztük őket. A maghőmérsékletüket 37°C -on tartottuk. 2F mikrohegyű nyomás-volumen katétert (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX, USA) illesztettünk a jobb carotis artériába és az aszcendáló aortába vezettük. 5 percnyi stabilizáció után rögzítettük az artériás vérnyomásértékeket. Az átlagos artériás nyomást (MAP) egy speciális szoftver (PVAN, Millar Instruments, Houston, TX, USA) segítségével számítottuk ki.

A vérnyomásmérés végeztével vért vettünk a vena cava inferiorból, a vérből szérumot készítettünk és ezt használtuk fel a további mérésre. Steril vizeletmintát húgyhólyag punkció révén nyertünk, közvetlenül a szervek kivétele előtt.

A szérum és vizelet glukóz, a szérum urea értéket és a vizelet kreatinin koncentrációt fotometriásan határoztuk meg Reflotron készülékkel (Roche, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Németország). A vizelet fehérje koncentráció-méréshez BCA Protein Assay-t (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) használtunk. A mért értékekből meghatároztuk a vizelet protein/kreatinin hányadost (UPCR).

A szérum ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) szinteket kereskedelmi forgalomban kapható enzim immun-assay (EIA) kittel határoztuk meg (Amersham cGMP EIA Biotrak System, GE Healthcare, Buckinghamshire, Egyesült Királyság), a gyártó utasításainak megfelelően.

3.6 Vese szövettan és immunhisztokémia

A vesemintákat 10%-os pufferolt formalinban fixáltuk 16-24 órán keresztül. A dehidrációt és paraffin beágyazást követően 4 µm-es metszeteket készítettünk. A paraffinos metszetek szövettani kiértékelésére perjódsva Schiff (PAS) festést követően értékeltük történt (PAS staining kit, Merck Chemicals, Darmstadt, Németország).

3.7 Glomeruloszklerózis index

A vesekárosodást glomerulosclerosis és tubulointersticiális károsodás mértéke szerint pontoztuk. Pontozási rendszerünkhöz (0-4 fokozat) El Nahas (163) glomeruloszklerózis index (GSI) beosztását alkalmaztuk. 0. fokozat: nincs eltérés, egészséges glomerulus; 1. fokozat: a kapillárisok kitapadnak a Bowman-tokhoz; 2. fokozat: mezangiális mátrix felgyülemelés a glomerulus 25%-ában; 3. fokozat: mezangiális mátrix felgyülemelés a glomerulus 50%-ában és kapilláris elzáródások; 4. fokozat: mezangiális mátrix felhalmozódás a glomerulus több mint 75%-ában. Minden állat GSI-jét fénymikroszkópban, 400x-os nagyítás mellett határoztuk meg 100 kiértékelt glomerulus pontjainak számtani közepéből. A minták kiértékelését vakon végeztük.

3.8 Tubulointersticiális károsodás mértéke

A tubulointersticiális károsodás mértékét másik pontozási rendszer szerint becsültük meg a fénymikroszkóp 100x-os nagyítása alatt: 0. fokozat: nincs eltérés; 1-5.

fokozat aszerint, hogy az alábbiak közül hány kritérium teljesült az adott látótérben: tubulustágulat, tubuláris atrófia, hialin a tubuluslumenben, mononukleáris sejtek intersticiális infiltrációja, intersticiális fibrózis. A minták tubulointersticiális kiértékelését szintén vakon végeztük.

3.9 Immunhisztokémia lépései

Az immunhisztokémiai festéseket avidin-biotin módszer segítségével paraffinos metszeken végeztük. A metszetek rehidrálása leszálló alkohol sorral történt, 5-5 perces mosás xilol, 100%-, 100%-, 90%-, 70%-os etil alkohol, végül desztillált vizes kádakban. Ezt követően pH 6,0-os citrát pufferrel történő forralással 20 percig végeztünk antigén feltárást, mikrohullámú sütőben. A 20 perces forralást követően a metszetek 20 percig hűltek szobahőn. Ezután desztillált vizes, majd TBS (Tris-buffered saline) pufferben történő mosást követően a mintákat TBS-ben oldott 5%-os kecske szérummal blokkoltuk 30 percig. A blokkolást követően a metszeteket 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül az alábbi primer antitestekkel:

- fibronektin (anti-fibronektin, nyúl poliklonális antitest, 1:1000, Sigma-Aldrich, Budapest),
- transzformáló növekedési faktor-béta1 (anti-TGF- β 1 nyúl poliklonális antitest, 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA),
- dezmin (anti-dezmin, egér monoklonális antitest, 1:50, Dako, Frank Diagnosztika, Budapest),
- nefrin (anti-nefrin, nyúl poliklonális antitest, 1:200, Abcam, Cambridge, MA, USA),
- nitrotirozin (anti-nitrotirozin, nyúl poliklonális antitest, 1:200, Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA),
- cGMP (anti-cGMP, nyúl poliklonális antitest, 1:2000, AbD Serotec, Düsseldorf, Németország).
- SCAI (anti-SCAI, nyúl poliklonális antitest, 1:1000, Sigma-Aldrich, Budapest)

Másodlagos antitestként biotinilált kecske anti-nyúl SuperSensitive Link-et (Biogenex, San Ramon, CA, USA) használtunk, a gyártó előírásának megfelelően 30 perces

inkubációs idővel. Ezt követően alkalikus foszfatázzal konjugált streptavidinnel (AP Link, Biogenex) inkubáltuk a mintákat újabb 30 percig. Végül alapos TBS mosást követően a metszeteket Fast Red szubsztráttal hívtuk elő (Dako, Frank Diagnosztika, Budapest).

Az immunhisztokémiai reaktivitást fénymikroszkóppal vizsgáltuk 400x-os nagyításon, szemikvantitatív pontozási módszer segítségével. A desmin, TGF- β és SCAI festődést az alábbi pontozási (score) rendszerrel értékeltük ki: 0 pont: nincs festődés; 1 pont: gyenge festődés; 2 pont: mérsékelt festődés; 3 pont: erős festődés.

A fibronectin festődést és a glomeruláris cGMP tartalmat Hirschberg és mtsai. nyomán a következőképp értékeltük (164): intenzitás érték (1 pont: gyenge festődés; 2 pont: mérsékelt festődés; 3 pont: erős festődés) és területi kiterjedés érték (1 pont: 0-10%-nyi területen pozitív festődő sejtek; 2 pont: 11-50%-nyi területen pozitívan festődő sejtek; 3 pont: 51-80%-nyi területen pozitívan festődő sejtek) meghatározása után látóterenként átlagot számoltunk, majd az intenzitás értéket összeszoroztuk a területi kiterjedés értékekkel.

A nefrin és cGMP kettős festést fagyasztott metszeteken végeztük. Az acetonban fixált metszketek PBS oldatban rehidráltuk, majd 5%-os kecske szérummal blokkoltuk. Az elsődleges antitestekkel (anti-cGMP, 1:4000, AbD Serotec, és tengeri malac poliklonális anti-nephrin, 1:500, Fitzgerald Industries, Acton, MA, USA) egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. PBS oldatos mosást követően a másodlagos antitestekkel (Dylight-488 konjugált szamár anti-tengeri malac és Cy3 konjugált szamár anti-nyúl, mindkettő 1:500 hígításban, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) inkubáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Mosás után lefedtük a metszeteket és fluoreszcens mikroszkóp alatt értékeltük ki őket.

A minták kiértékelését vakon végeztük.

3.10 Western-blot

Állatonként 20 mg teljes vese mintát homogenizáltunk proteáz inhibitor tartalmazó, jéghideg RIPA lízis pufferben (radioimmunoprecipitation assay buffer: 50mM TRIS pH 7-8; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Na-deoxikolát; 1% NP-40; EDTA-free complete mini proteáz inhibitor, Roche), 2 ml-es szövet homogenizáló

üvegmozsár (douncer) segítségével. A minták fehérje koncentrációját bicinkoniniksavas módszerrel mértük meg (BCA Protein Assay kit Pierce, Rockford, IL, USA): 10 µl mintához 1 ml BCA reagenst adtunk, majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk a mintákat, majd „blank” ellenében 562 nm-en spektrométerrel (Victor Multilabel plate reader, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) meghatároztuk az abszorbanciát. Az egyes abszorbancia értékekhez tartozó fehérje koncentrációkat marha szérum albumin hígítási sor alapján készített standard görbe segítségével határoztuk meg.

Futtatás előtt a mintákhoz 2x Laemmli puffert adtunk (375 mM TRIS (pH 6,8), 10% SDS, 20% glicerin, 0,005% brómfenol kék és 2% β-merkaptóetanol) és 100 °C-on 5 percig forraltuk száraz blokkmelegítő segítségével (dry block heater, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

A mintákat 10%-os redukáló nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid géleken szeparáltuk Mini Protean II és III apparátusok (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével. A mintákból azonos mennyiségű (40 µg) fehérjét töltöttünk a gélekre, majd 160 V feszültségen futattuk a következő pufferben (50 mM TRIS (pH 8,3), 196 mM glicin, 0,1% SDS). A fehérjéket szeparálódás után nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) transzferáltuk Towbin-féle transzfer pufferben (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,3) 100 V feszültséggel, 90 percig. A transzferálás hibáit a membrán Ponceau S festésével ellenőriztük. A membránokat 5% tejport és 0,1% Tween-20-at tartalmazó TBS oldatban (20 mM TRIS, 137 mM NaCl) blokkoltuk 1 órán keresztül. Majd rövid T-TBS-sel végzett mosás után, a membránokat 4 °C-on egy egész éjszakán keresztül inkubáltuk az elsődleges antitestet tartalmazó oldatokban:

- nyúl poliklonális anti-PDE5a antitest (1:1000, Enzo, Plymouth Meeting, PA, USA); vagy
- egér monoklonális anti-SMA (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- egér monoklonális anti-glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) antitest (1:2000, Millipore, Billerica, MA, USA).

Másnap a membránokat 6-szor 5 percig mostuk T-TBS oldattal, majd peroxidáz konjugált másodlagos antitest oldatban (anti-nyúl IgG vagy anti-egér IgG, 1:2000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) inkubáltuk a membránokat egy órán keresztül. Végül a membránokat alaposan mostuk T-TBS-sel, és a peroxidáz-pozitív csíkokat

kemilumineszcens reakcióval (ECL, Pierce Thermo) jelenítettük meg. Az immunoreaktív csíkok felett a reakció által emittált fényt GeneGnome (Syngene, Frederick, MD, USA) képalkotóval és a hozzátartozó szoftverrel detektáltuk és analizáltuk.

3.11 Kvantitatív RT-PCR (qPCR)

100 mg teljes vese homogenizátumból izoláltuk az össz RNS-t, SV Total RNA kit (Promega, Madison, WI, USA) segítségével a gyártó protokollja szerint. Az RNS koncentrációt fotometriásan határoztuk meg 260 nm-en (NanoDrop, Thermo). Az RNS integritást 1%-os agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztük. A mintákat etidium bromiddal festettük meg, majd mintánként 1 µg RNS-t töltöttünk a gélre, végül UV fényben vizualizáltuk a megjelenő 28S és 18S rRNS csíkokat (G-Box, Syngene). Minden további vizsgálatot csak intakt RNS esetén végeztünk, ahol a 28S és a 18S rRNS-ek aránya 2:1.

Mindegyik PCR reakció egy BioRad CFX thermal cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) készülékben történt, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával, 95°C-on 15 s és 60°C-on 60 s 40 cikluson keresztül. A reverz transzkripciót az Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük 2µg RNS-sel és random primerekkel összesen 25µl térfogatban. A qPCR reakciók specificitását és hatékonyságát az olvadási görbék és standardok analízise igazolta. Minden mintát duplikátumban mértünk, és GAPDH expresszióra normalizáltunk, a $2^{-\Delta Ct}$ formula segítségével. A felhasznált primer szekvenciák a következők:

Patkány: TGF-β1 szenz: 5-CACCATCCATGACATGAACC-3;

TGF-β1 antiszenz: 5-TCATGTTGGACAACCTGCTCC-3;

eNOS szenz: 5-TGACCCTCACCGATACAACA-3;

eNOS antiszenz: 5-CTGGCCTTCTGCTCATTTTC-3;

nNOS szenz: 5-GACAACGTTCCCTGTGGTCCT-3

nNOS antiszenz: 5-TCCAGTGTGCTCTTCAGGTG-3

Nefrin szenz: 5-GCCTCTTGACCATCGCTAATG-3

Nefrin antiszenz: 5-GACAACCTTCAGTCCCAGTG-3

Podocin szenz: 5-TCCCTTTTCCATCTGGTTCTG-3

Podocin antiszenz: 5-CTTGTGATAGGT-GTCCAGGC-3;

GAPDH szenz: 5-CAATGACCCCTTCATTGACC-3

GAPDH antiszenz: 5-CGCCAGTAGACTCCACAACA-3;

Egér: SCAI-szenz: 5-ACCCCTGTTCATCGTTGTG-3,

SCAI-antiszenz: 5-CGAGTGGCTGTCCAAACAA-3;

GAPDH-szenz: 5-CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG-3,

GAPDH-antiszenz: 5-TCTTGCTCAGTGCCTTGC-3.

A PCR kondíciók a következők voltak: patkány GAPDH: 95 °C 10 s, 57 °C 10 s, 72°C 20 s; TGF- β 1: 95 °C 10 s, 54 °C 10 s, 72 °C 18 s; eNOS: 95°C 10 s, 62 °C 10 s, 72 °C 12 s, egér SCAI és GAPDH: 95°C-on 15 s és 60°C-on 60 s. A PCR reakciók specificitását az olvadási görbe analízisével igazoltuk. Minden mintát génspecifikus standard görbével kvantifikáltunk, és az eredmények kiértékelésében minimum három párhuzamos mérés átlagértékét vettük figyelembe.

3.12 Egér podocita sejtvonal vizsgálata

Kísérletünkben immortalizált termoszenzitív SV40-T génnel transzfektált egér podocita sejteket használtunk (Mundel et al., 1994, Jeffrey Kopp, NIH). A podocitákat 33°C-on permisszív körülmények között növesztettük fel, kollagén I oldattal felületkezelt sejtenyésző flaskában, RPMI 1640-es médiumban (Sigma-Aldrich), amely tartalmazott még 1 x PenStrep (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% FBS-t (fetal bovine serum) (PAA Laboratories, Eotbicoke, Ontario, Kanada), és 30 U/ml egér interferon- γ -t (Miltényi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország). A negyedik passzálást követően, amikor a sejtek elérték a 70%-os konfluenciát, két csoportra osztottuk a plate-eket (n=5 plate/csoport), megvontuk az interferon- γ -t, és 37°C-on nem-permisszív körülmények között differenciáltattuk a sejteket. Öt napos differenciálódást követően az egyik csoport az 5mM glukózt tartalmazó médiumot kapta továbbra is (Normoglikémiás), a másik csoport 25mM glukózt tartalmazó médiumot kapott (Hiperглиkémias). A sejtekből 48h és 7 nap után RNS-t izoláltunk Trizol oldattal (Invitrogen) a gyártó előírása szerint. A reverz transzkripciót és a PCR reakciót a már előzőleg említettek szerint végeztük.

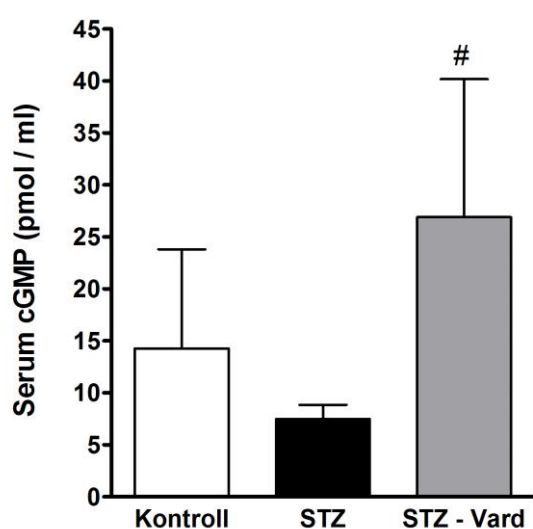
3.13 Statisztikák

Minden adatot átlag \pm szórás (SD) formában tüntettünk fel. A csoportok közötti különbségek kiértékelésére először normalitás vizsgálatot végeztünk. A normál eloszlású funkcionális mérések és a vér laborértékek eredményeit ANOVA segítségével hasonlítottuk össze Tukey post-hoc teszttel. A nem normál eloszlást mutató szövettani, immunhisztokémiai és qPCR eredményeket Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéken határoztuk meg, a kiértékelést SPSS 10.0 szoftver segítségével végeztük (SPSS Inc, IBM, Armonk, NY, USA).

4 Eredmények

4.1 A ciklikus GMP szint emelése szelektív foszfodiészteráz-5 gátlóval csökkentette a podocita károsodás mértékét diabéteszes patkányban

4.1.1 Vardenafil kezelés hatására megemelkedett a szérumban a cGMP szint diabéteszes állatokban

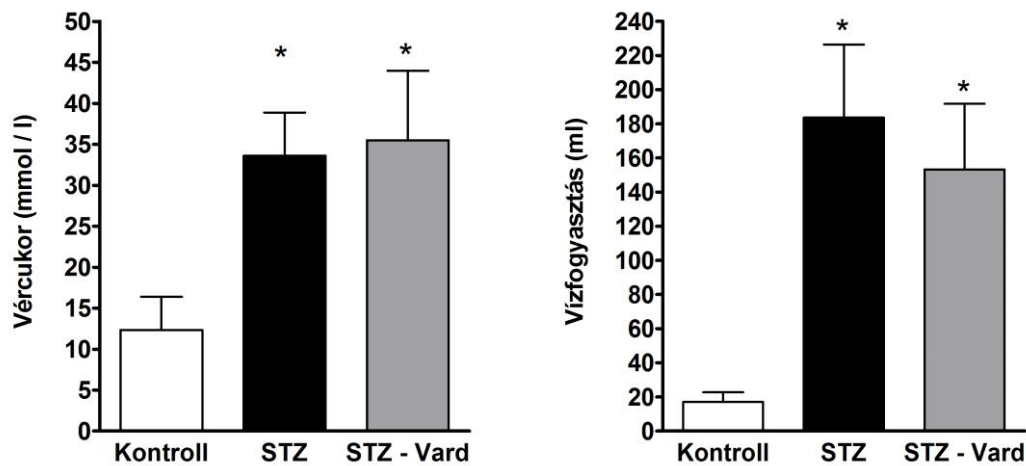


8. ábra: A szérumban a cGMP változása vardenafil hatására. #: $p < 0.05$ vs. STZ (ANOVA). Diabétesz hatására tendenciájában csökkent a cGMP szint, míg a vardenafil kezelés szignifikánsan megemelte a cGMP szintet. (Kontroll, $n=7$; STZ, $n=6$; STZ-Vard, $n=8$)

Diabétesz indukció után az érintett csoportokban (STZ és STZ-Vardenafil) a szérumban a glukóz szintek és a napi vízfogyasztás jelentősen megnövekedett (9. ábra). A vardenafil kezelés nem befolyásolta ezeket a paramétereket.

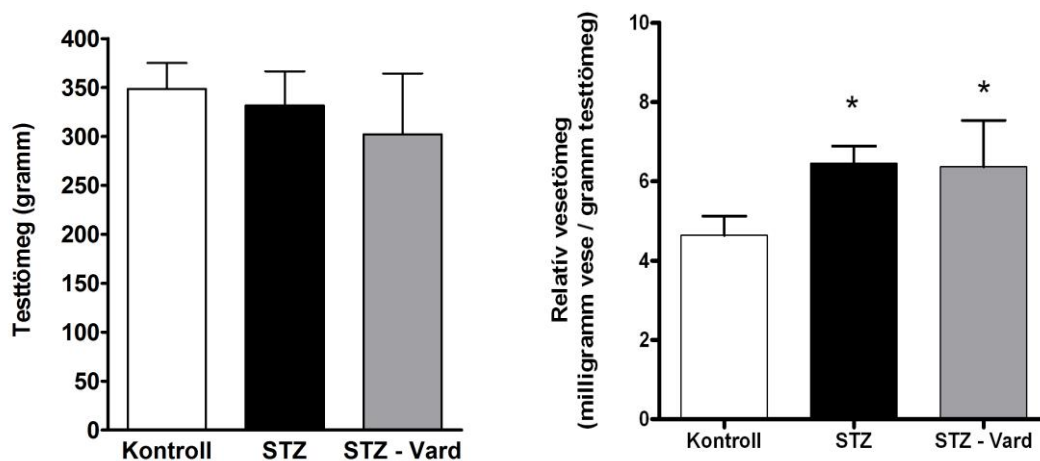
A szérumban a cGMP szint a kezeletlen diabéteszes csoportban tendenciájában alacsonyabb volt, mint az egészséges kontroll csoportban, de a különbség nem volt szignifikáns feltehetően a kontroll állatok nagy szórása miatt. A vardenafilal kezelt állatok szérumban ezzel szemben mindkét csoportnál szignifikánsan magasabb cGMP értéket mértünk, ami igazolja a PDE5 gátló kezelés hatásosságát (8. ábra).

4.1.2 A vardenafil kezelés nem befolyásolta a metabolikus paramétereket, a vesehipertófiát és a vérnyomást



9. ábra A szérum glukóz szint (balra) és a napi vízfogyasztás (jobbra) diabétesz indukció után. *:p<0.05 vs. Kontroll (ANOVA) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

A csoportokban mért átlagos testtömeg nem különbözött szignifikáns mértékben, bár a diabéteszes állatok testtömege tendenciájában kisebb volt, mint a nem diabéteszes kontrolloké. Ugyanakkor szignifikáns vese hipertrófia alakult ki a cukorbeteg állatokban, amelyet a megnövekedett vesetömeg/testtömeg arány is mutat. A vardenafil kezelésnek nem volt hatása sem a testtömege, sem a vesetömege, a kezeletlen diabéteszes csoporthoz képest (10. ábra)



10. ábra: A testtömeg (balra, gramm) és a testtömege normalizált vesetömeg (jobbra, milligramm vese/gramm testsúly) a kezelési csoportokban. *:p<0.05 vs. Kontroll (ANOVA) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

A szérum urea szintek a diabéteszes állatokban magasabb volt, mint a kontroll csoportban. A vardenafil kezelés nem volt hatással a szérum urea szintekre. Az artériás középnyomás (MAP) értékei azonban nem különböztek a három csoportban (1. táblázat).

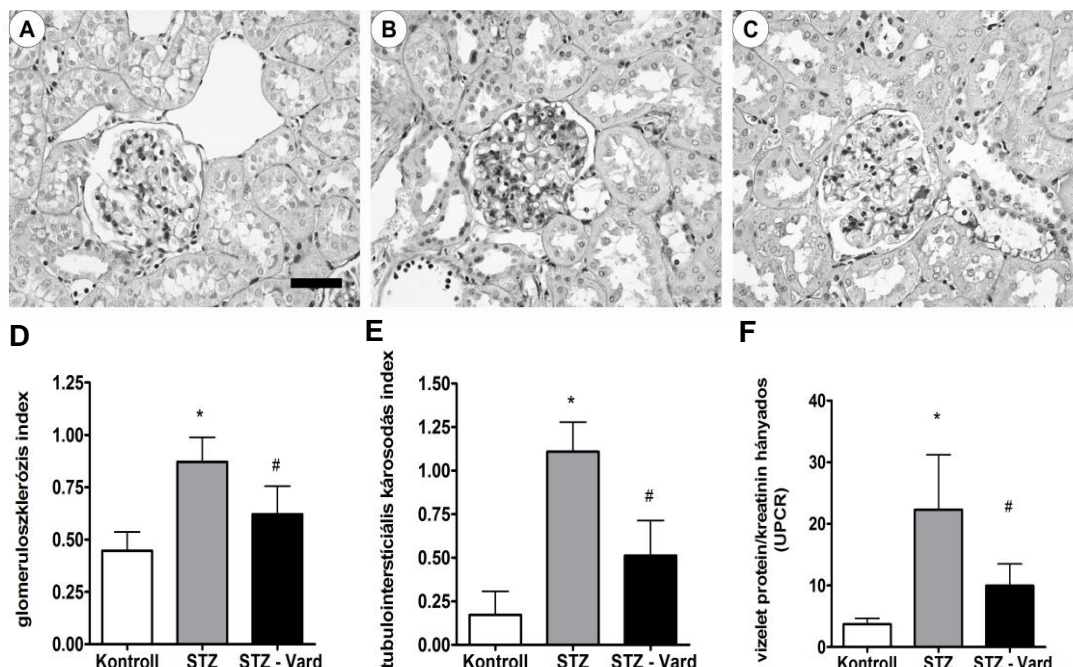
	Szérum urea (mmol/l)	Artériás középnyomás MAP (Hgmm)
Kontroll	53.1 ± 9.8	77.2 ± 8.1
STZ	73.2 ± 16.7*	72.8 ± 5.1
STZ-Vard	64.1 ± 13.9*	77.6 ± 12.8

1. táblázat: A szérum urea (balra, mg/dl) és artériás középnyomás (MAP) (jobbra, Hgmm) a kezelési csoportokban. *:p<0.05 vs. Kontroll (ANOVA) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

4.1.3 Diabéteszes állatokban vardenafil kezelés hatására csökkent a proteinuria, a glomeruláris remodelling, a fibronectin és a TGF- β_1 expresszió

A cukorbetegség következtében glomeruláris és tubuláris károsodás jött létre, amit a kezeletlen állatoknál (STZ) mért emelkedett vizelet protein/kreatinin hányados (UPCR) jellemez. Vardenafil kezelés hatására szignifikánsan csökkent a vizelet protein/kreatinin hányados (11. ábra F).

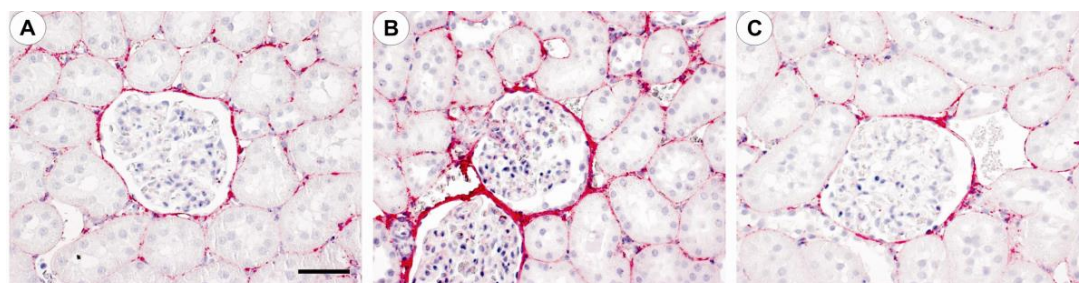
Az állatok veséjéből készült metszeteket PAS festés után vizsgáltuk meg fénymikroszkóposan. A nem diabéteszes kontroll állatok veséje egészséges volt. Az STZ-Kontroll állatok veséjében glomeruláris hipertrófiát, enyhe mezangiális kiszélesedést, és a Bowman-tokhoz való kitapadást találtunk. A tubulointersticiális károsodást az STZ állatokban tubuláris dilatáció és atrófia jellemezte. Vardenafil kezelés hatására szignifikánsan csökkent a kezelt diabéteszes patkányok glomeruloszklerózisa és a tubulointersticiális elváltozások mértéke (11. ábra ABCDE). Mononukleáris sejtek beszűrődése nem volt tapasztalható a nem diabéteszes kontroll vesékben, és a diabéteszes vesékben is kezeléstől függetlenül csak minimális mértékben.



11. ábra Vesék szövettani kiértékelése és vizelet protein/kreatinin hányados.

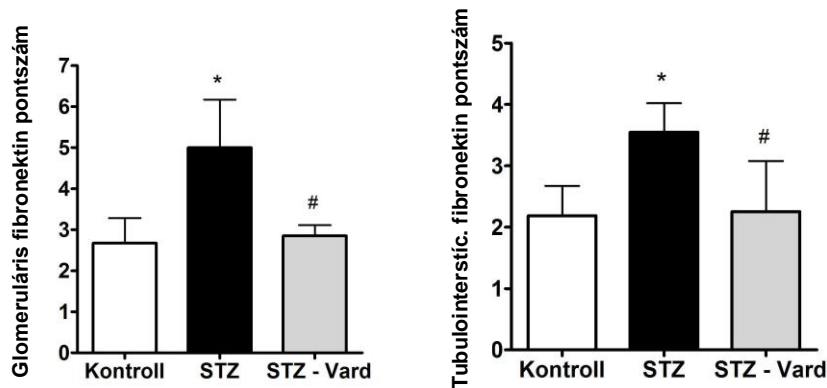
Fent: reprezentatív képek (400x nagyítás) a PAS-festett vesék metszeteiből. Normális glomeruláris struktúra látható a kontroll vesében (A), enyhe mezangiális expanzió és Bowman-tokhoz kitapadás az STZ csoportnál (B), és normál struktúra az STZ-Vard csoportban (skála: 50 μ m), D, E: glomeruláris és tubuláris károsodás kiértékelésének grafikonjai. F: vizelet protein/kreatinin hányados (mg/mg). *:p<0.05 vs. Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

Immunhisztokémiai vizsgálatok során az STZ-Kontroll állatok veséje fokozott fibronektin expressziót mutatott az egészséges kontrollhoz viszonyítva. A vardenafillal



12. ábra Fibronektin immunfestés. Reprezentatív mikrofényképeken (400x-os nagyításban) láthatjuk a glomerulus és a tubulointerstícium enyhe festődését a Kontroll csoportban (A), erősebb festődést az STZ csoportban (B), és enyhe festődést az STZ-Vard csoportban. Skála: 50 μ m.

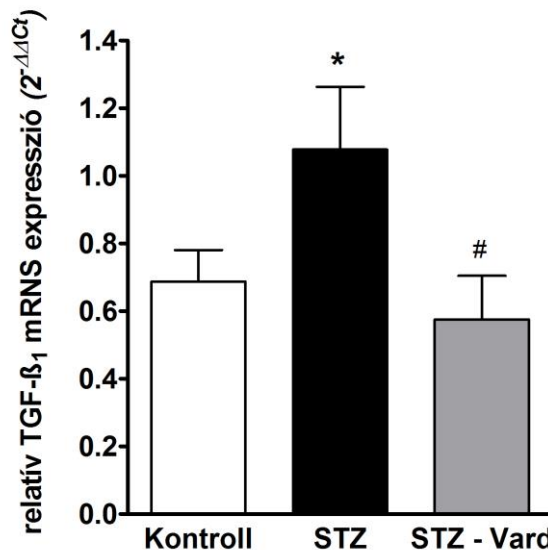
kezelt csoportban a festődés szignifikánsan gyengébb volt, ami a kezelés antifibrotikus hatására utal. (12. és 13. ábra)



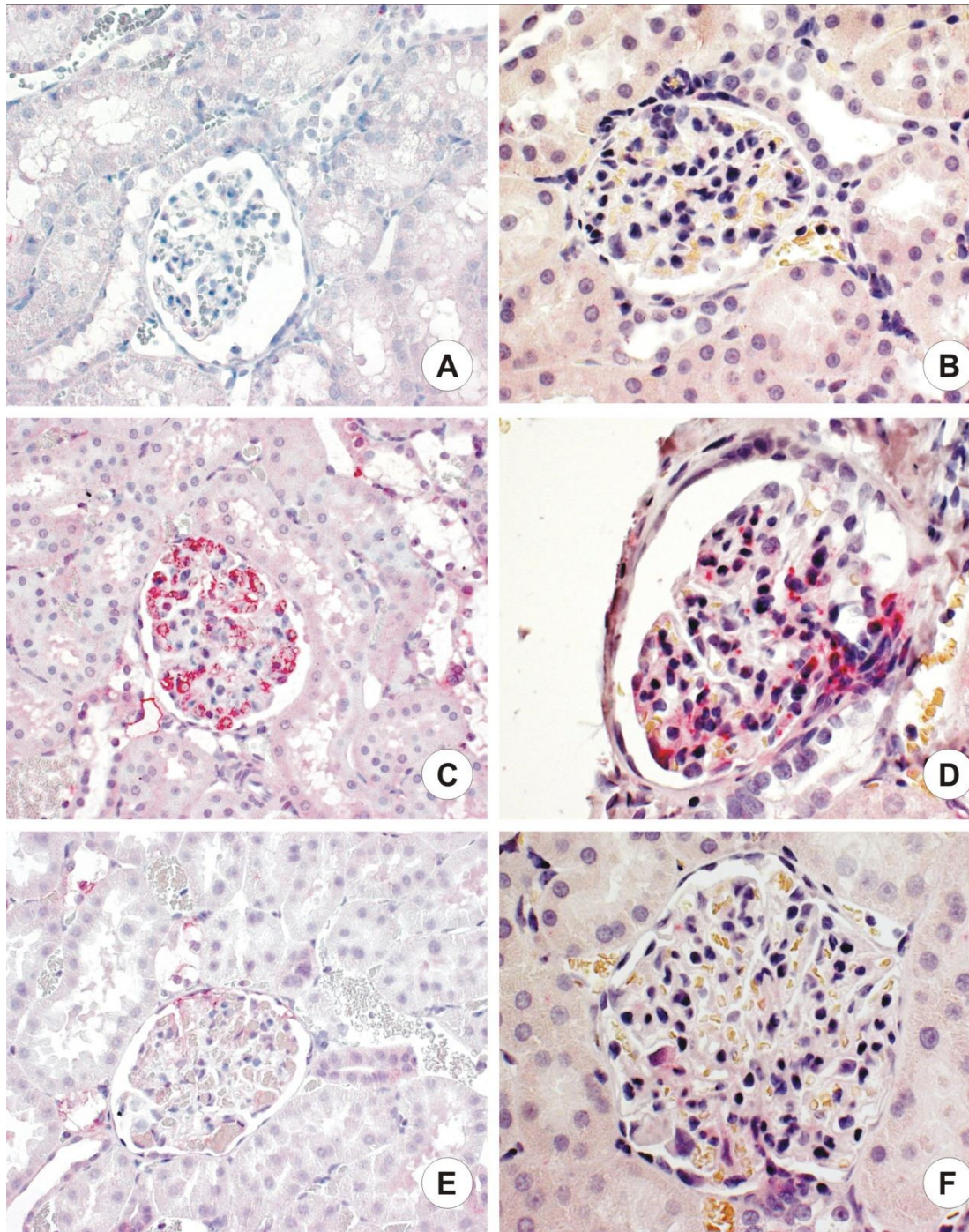
13. ábra Glomeruláris és tubulointersticiális fibronektin immunfestés pontozás grafikonjai. *:p<0.05 vs. Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

A teljes vese homogenizátumból mért TGF- β 1 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen cukorbeteg (STZ-Kontroll) állatokban, mint az egészséges kontrollokban. A vardenafil kezelés (STZ-Vardenafil) normalizálta a TGF- β 1 mRNS expressziót (14. ábra), amely szintén a kezelés antifibrotikus hatását mutatja.

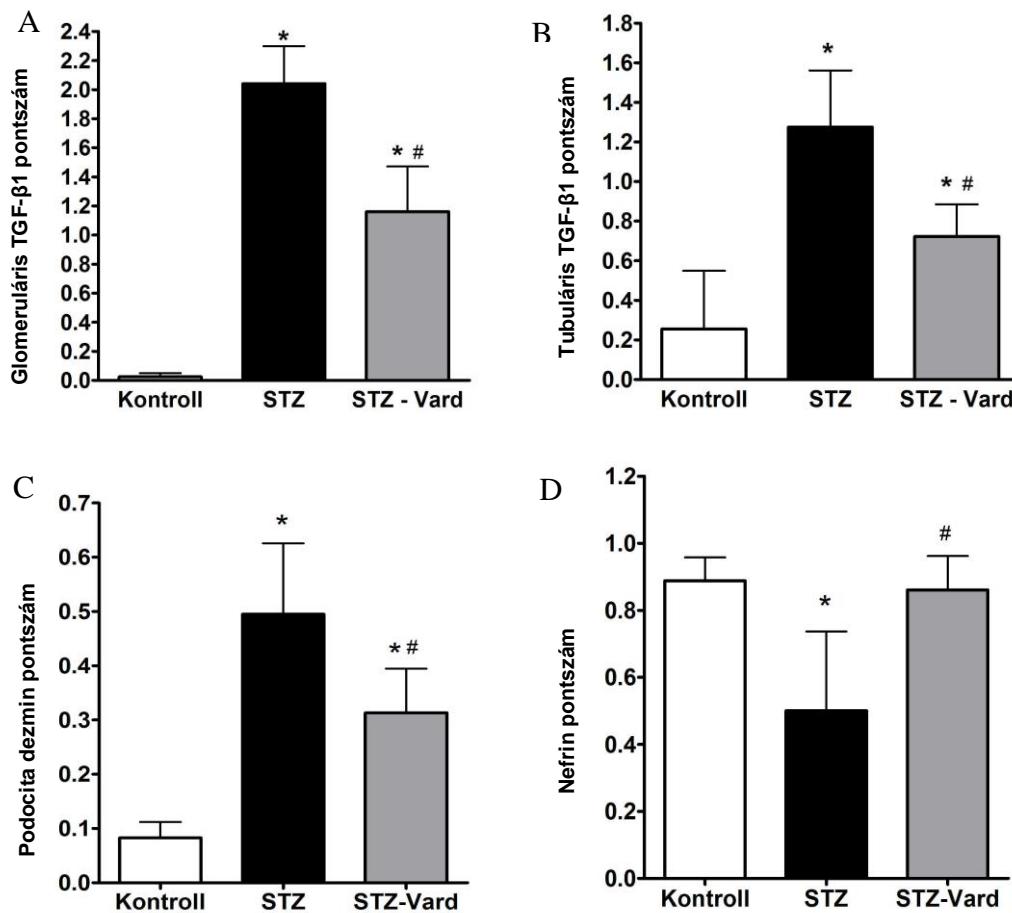
A TGF- β 1 fehérje expressziójának immunhisztokémiás kiértékelésénél az STZ-Kontroll állatoknak mind a glomerulusaiban, mind a tubulointerstíciumában fokozott expressziót találtunk a kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a vardenaffillal kezelt csoportban a festődés jóval gyengébb volt (15. ábra ACE, 16. ábra AB), ami jól korrelál az mRNS expressziós vizsgálat eredményével.



14. ábra: TGF- β 1 mRNS expresszió a vesében. *:p<0.05 vs Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)



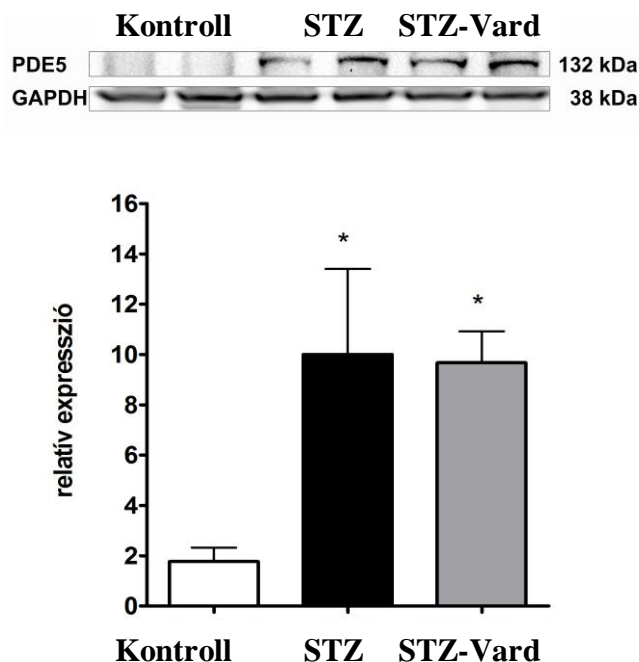
15. ábra: TGF- β 1 és desmin immunhisztokémia reprezentatív képei. Kontroll (A, B), STZ-Kontroll (C, D) és STZ-Vard (E, F). A, C, E: TGF- β 1 fehérje expresszió. B, D, F: desmin expresszió a podocitákban. (400x nagyítás)



16. ábra. TGF-β1, dezmin és nefrin immunexpresszió kiértékelésének grafikonos megjelenítése. TGF-β1 fehérje expresszió mind a glomerulusokban (A), mind a tubulo-interstíciumban (B) fokozódott kezeletlen diabéteszes patkányokban, amit a vardenafil kezelés szignifikánsan csökkentett. A podocita dezmin (C) és nefrin (D) expresszió a podocitakárosodást egymáshoz képest fordított módon jelzik. A dezmin expresszió megnövekedett diabéteszben, és vardenafil kezelésre csökkent az expressziója. A nefrin expresszió lecsökkent diabéteszben, és vardenafil kezelésre normál szintre emelkedett. Szemikvantitatív kiértékelés. *:p<0.05 vs. Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

4.1.4 Vardenafil kezelés hatására helyreállt a podociták cGMP tartalma és csökkent a podocita károsodás mértéke

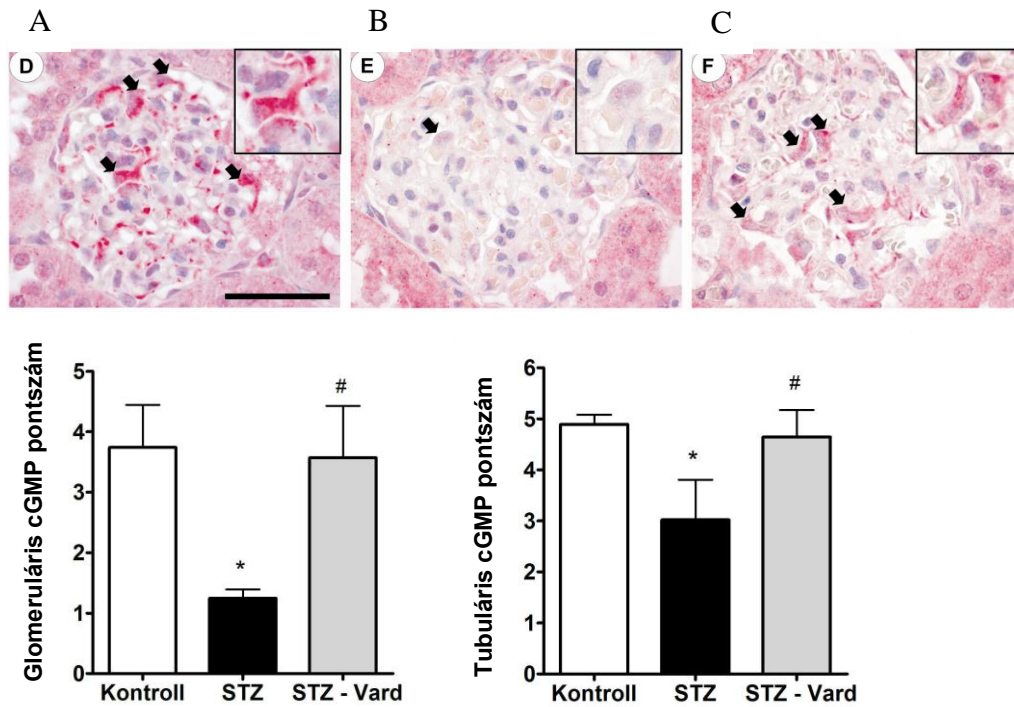
Immunblott segítségével fokozott PDE5 expressziót találtunk mind a kezeletlen, mind a kezelt diabéteszes állatok veséjében az egészséges kontrollokéhoz képest ($p < 0.05$, 17. ábra).



17. ábra A vesék PDE5 expressziójának immunoblot analízise. Balra a PDE5 (132kDa) és GAPDH (38kDa) reprezentatív blotjai láthatók (n=2/csoport). A PDE5 expressziót minden csoport esetén három gél eredményeinek átlagából számoltuk (n=2/csoport/gél). A PDE5-t expressziót GAPDH-hoz normalizáltuk, és egy, a kontroll csoportba tartozó kalibrátor minta expressziójához (amit 1-nek vettünk) hasonlítottuk minden többi minta expresszióját. *:p<0.05 vs. Kontroll (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

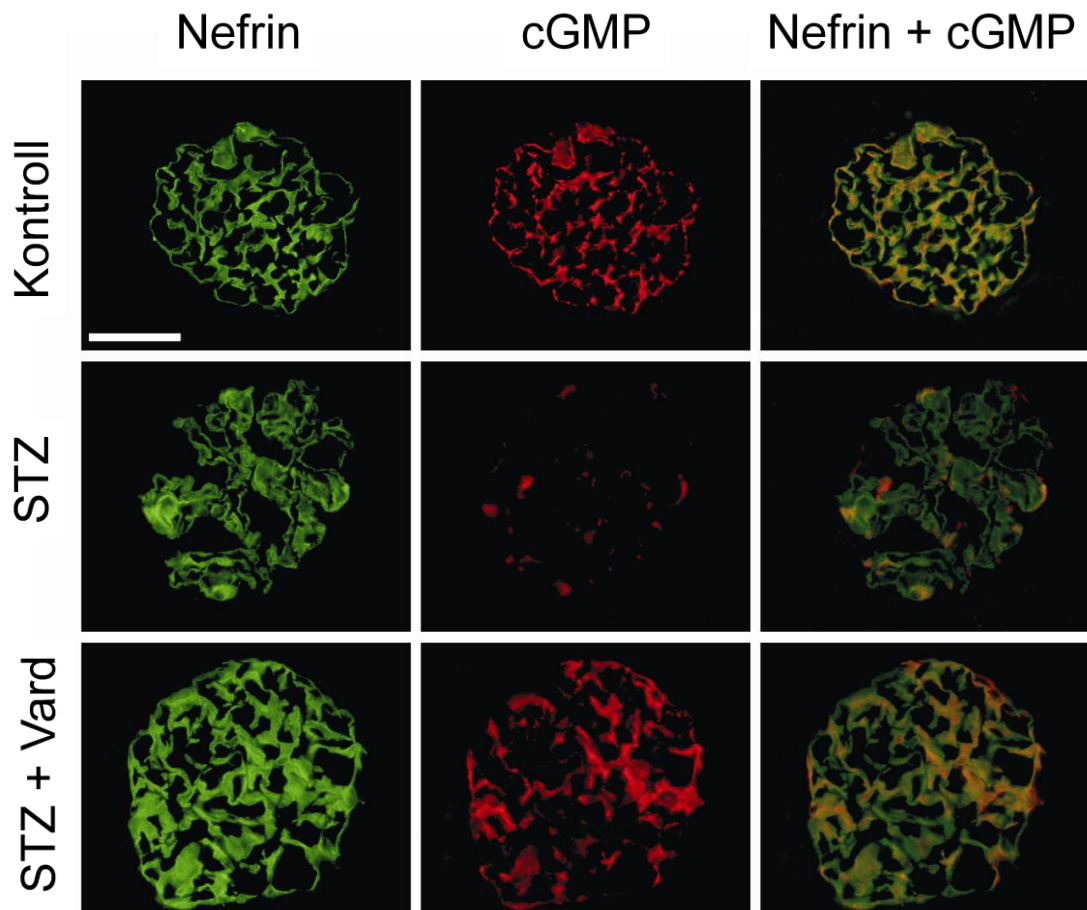
Immunfestéssel jelentős mértékű glomeruláris cGMP-t találtunk az egészséges kontroll vesékben, nagyrészt a podociták citoplazmájában (19. ábra A, nyilakkal jelölve, illetve a mellékképecskén) és kisebb mértékben az endotél sejtekben. A kezeletlen diabéteszes patkányok glomerulusaiban alacsonyabb volt a cGMP festődés intenzitása, amely vardenafil kezelésre szinte teljesen normalizálódott (18. ábra B, C). Hasonló

eredményt tapasztaltunk a tubuláris cGMP festés kiértékelésekor. Mindez arra utal, hogy a vardenafil kezelés a PDE5 gátlása révén segít megőrizni az intracelluláris cGMP tartalmat diabéteszes vesékben.

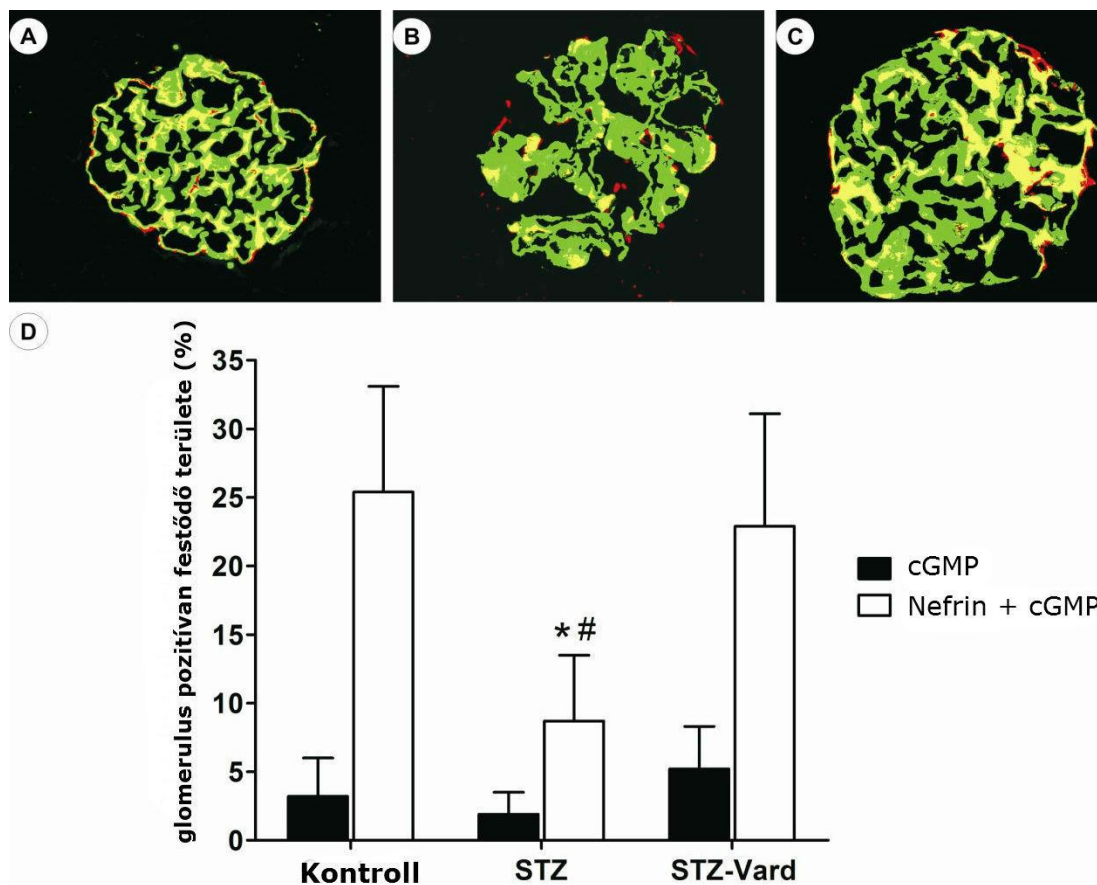


18. ábra cGMP immunfestés reprezentatív mikrofényképei és kiértékelése. A mikrofényképek 630x-os nagyításban, illetve a mellékképecskén a podociták 1000x-es nagyításban láthatók. Az intenzív cGMP festődés a nyilakkal jelölt podocitákban és endotélsejtekben (A), az STZ-csoportban csaknem eltűnik (B), az STZ-Vard csoportban helyreáll (C). Skála: 50 μ m. Alább a glomeruláris és tubulointersticiális cGMP festődés kiértékelésének grafikonjai. *:p<0.05 vs. Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

Fluoreszcens kettős immunfestés segítségével a cGMP és a nefrin jelentős glomeruláris kolokalizációját találtuk az egészséges kontroll és az STZ-Vard vesékben. Ezzel szemben a kezeletlen diabéteszes patkányok veséiben a cGMP festődés gyakorlatilag hiányzott a nefrin-pozitív sejtekből. (19. ábra). A cGMP-pozitív területek 2-5%-ában nem volt nefrin kolokalizáció a kapilláris kacsokban, amely feltehetően az endotél sejtek cGMP festését mutatta (20. ábra).



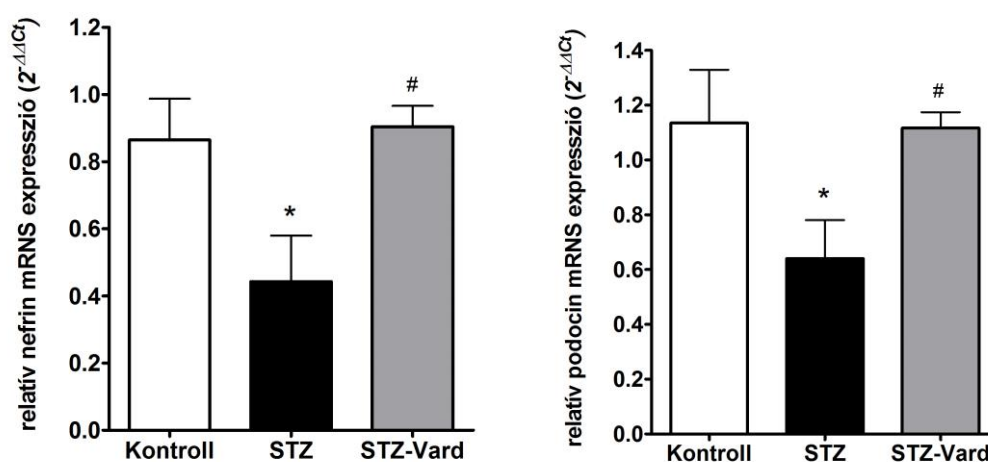
19. ábra Nefrin és cGMP lokalizációja kettős immunfluoreszcens festéssel. A nefrin festéssel a podociták ábrázolódnak a kontroll, az STZ és az STZ-Vard csoportokban (zöld szín, bal oszlop). Bőséges cGMP festődés figyelhető meg a kontroll és STZ-Vard glomerulusokban, míg az STZ csoportban szinte nincs cGMP festődés (piros szín, középső oszlop). Kettős festéssel látható a cGMP és a nefrin kolokalizációja (sárga szín), miszerint a diabétesz és a vardenafil kezelés befolyásolja a podociták cGMP tartalmát. (630x-os nagyítás, skála: 50 μ m) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)



20. ábra Nefrin és cGMP kettős immunfluoreszcens festés kiértékelése: a pozitívan festődött terület hogyan aránylik az össz-glomeruláris területhez képest kontroll (A), STZ (B) és STZ-Vard (C) csoportokban. (Zöld nefrin, sárga nefrin + cGMP, piros cGMP) Diabétiszben kevesebb podocita és cGMP rajzolódott ki, de vardenafil kezelésre normalizálódott. *: $p < 0.05$ vs. Kontroll, #: $p < 0.05$ vs. STZ (Kruskal-Wallis). (Kontroll, $n=7$; STZ, $n=6$; STZ-Vard, $n=8$)

Mivel az egészséges podociták jelentős mennyiségű cGMP-t tartalmaztak, a podocita károsodás mértékét is vizsgálni kívántuk a cGMP tartalom változásának tükrében. Ehhez dezmin és nefrin immunfestést végeztünk. A kezeletlen STZ csoportban szignifikánsan magasabb volt a dezmin expresszió, mint a nem-diabéteszes patkányok veséjében. A vardenafil kezelés szignifikánsan csökkentette a dezmin expresszió mértékét, a nem-diabéteszes és az STZ csoportban mérthez képest egy köztes szintre állította be (15. ábra BDF és 16. ábra C). Ezzel szemben a nefrin expresszió szignifikánsan lecsökkent az STZ-csoportban a nem-diabéteszes csoporthoz képest,

amely a vardenafil kezelés hatására normalizálódott (16. ábra D). A vesekárosodás progressziója során általában a podociták nefrin és podocin expressziója csökken, amely fokozódó proteinúriával jár együtt. Kísérletünkben mind a nefrin, mind a podocin mRNA expressziója megközelítőleg 50%-kal csökkent diabétesz hatására a nem-diabéteszes csoporthoz képest, amely vardenafil kezeléssel visszaállt a normális szintre (21. ábra).



21. ábra Nefrin (balra) és podocin (jobbra) mRNA expresszió a három csoportban. A nefrin és podocin fontos, rés-diafragmát alkotó fehérjék, expressziójuk lecsökkent diabéteszben, vardenafil kezelésre azonban normalizálódott. *:p<0.05 vs. Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis teszt) (Kontroll. n=7: STZ. n=6: STZ-Vard. n=8)

4.1.5 A vardenafil kezelés nem befolyásolta az oxidatív stressz markereit diabéteszes patkányokban

A lokális oxidatív stressz egyik lehetséges markereként nitrotirozin immunfestést végeztünk. A szemikvantitatív kiértékelés a kezeletlen diabéteszes állatok (STZ-Kontroll) glomerulusaiban és tubulointerstíciumában emelkedett nitrotirozin festődést mutatott, az egészséges kontrollokhöz képest. Ugyanakkor a vardenafil kezelés nem befolyásolta a nitrotirozin képződést (2. táblázat).

Az NO szintáz (NOS) változás detektálásához mindhárom izoforma (nNOS, eNOS és iNOS) mRNA expresszióját megvizsgáltuk. Az nNOS expresszió a kezeletlen

és kezelt diabéteszes állatokban szignifikánsan emelkedett volt, azonban a vardenafillal kezelt állatokban szignifikánsan kisebb mértékben emelkedett a kezeletlenekhez képest. Az eNOS expresszió tendenciájában magasabb volt a diabéteszes állatokban a kontroll csoporthoz képest, de a különbség statisztikailag nem szignifikáns. A vardenafil kezelés nem befolyásolta az eNOS expressziót. Az iNOS mRNS expressziója mindhárom csoportban hasonlóan alakult (2. táblázat).

	Nitrotirozin		qPCR NO szintáz izoformák		
	glomeruláris	tubuláris	eNOS	nNOS	iNOS
Kontroll	0.19 ± 0.08	0.18 ± 0.15	0.66 ± 0.12	0.81 ± 0.39	0.63 ± 0.17
STZ	0.64 ± 0.07*	0.56 ± 0.11*	0.96 ± 0.16	9.68 ± 3.28*	0.65 ± 0.24
STZ-Vard	0.56 ± 0.14*	0.59 ± 0.07*	0.93 ± 0.28	5.29 ± 2.09*#	0.47 ± 0.19

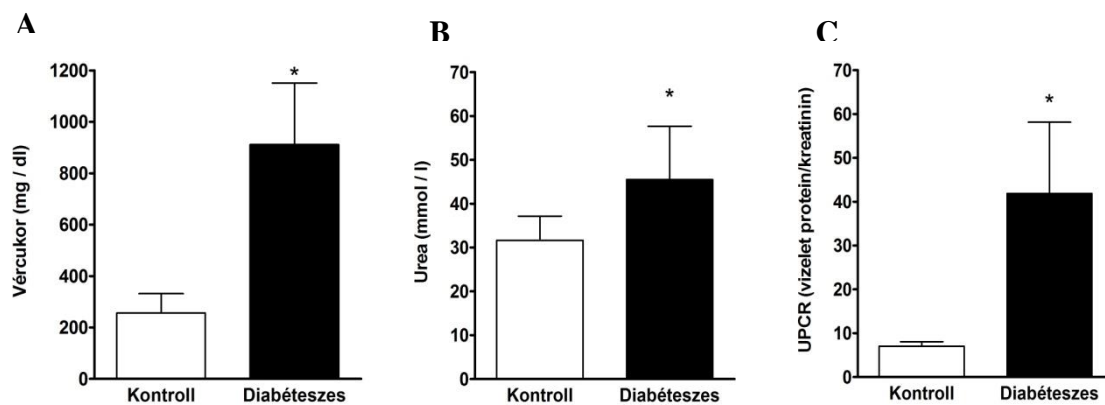
2. táblázat Nitrotirozin immunfestés és NO szintáz izoformák qPCR eredményei.

*:p<0.05 vs. Kontroll, #: p<0.05 vs. STZ (Kruskal-Wallis) (Kontroll, n=7; STZ, n=6; STZ-Vard, n=8)

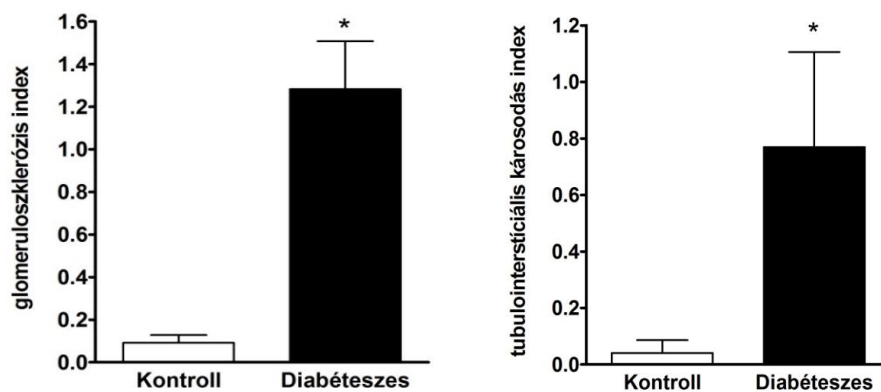
4.2 SCAI expresszió vizsgálata diabéteszes nefropátiában

4.2.1 Diabéteszes nefropátia patkánymodellben szignifikánsan csökkent a SCAI fehérje expresszió a tubulusokban

Diabétesz indukció hatására megemelkedett a vizelet protein/kreatinin hányados, a szérumban a glükóz, és a szérumban a urea érték a diabéteszes patkányokban a nem-diabéteszesekhez képest. (22. ábra A, B, C)

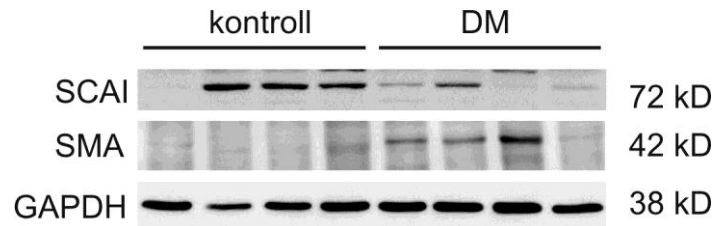


22. ábra Vércukor (A) szérumban urea (B) és vizelet protein/kreatinin hányados (C). *: $p < 0.05$ vs. Kontroll (Kruskal-Wallis) (Kontroll, $n=4$; Diabéteszes, $n=4$)

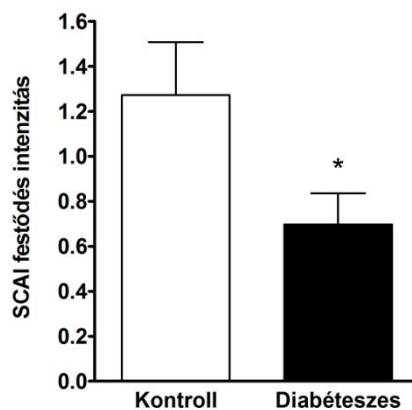
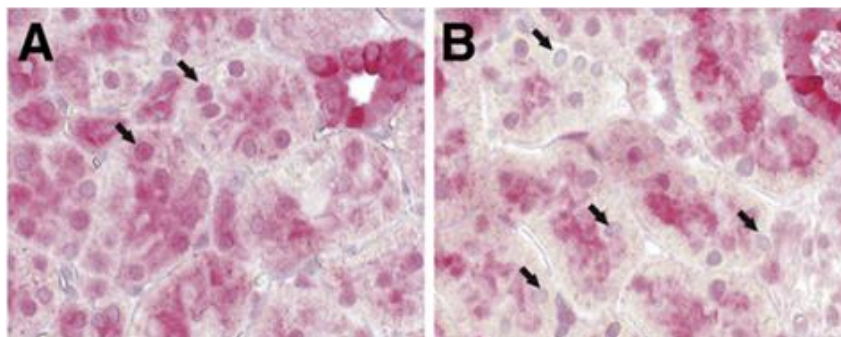


23. ábra Vesék szövettani kiértékelése. Balra: glomeruloszklerózis-, jobbra: tubulointersticiális károsodás mértéke *: $p < 0.05$ vs. Kontroll (Kruskal-Wallis) (Kontroll, $n=4$; Diabéteszes, $n=4$)

A diabéteszes állatokban glomeruláris és tubulointerstíciális károsodás alakult ki: mezangiális kiszélesedés és tubuláris atrófia, hialin lerakódások és enyhe mononukleáris sejtes beszűrődés, amely a korai diabéteszes nefropátiára jellemző (23. ábra).



24. ábra Patkányvese SCAI és α -SMA expressziója diabéteszes és kontroll csoportban. Belső kontroll fehérjeként GAPDH-t használtunk. A kontroll csoportban erős SCAI és gyenge α -SMA expresszió mutatkozott. Diabéteszben (DM) a SCAI expresszió szignifikánsan lecsökkent, míg az α -SMA expressziója megnőtt.

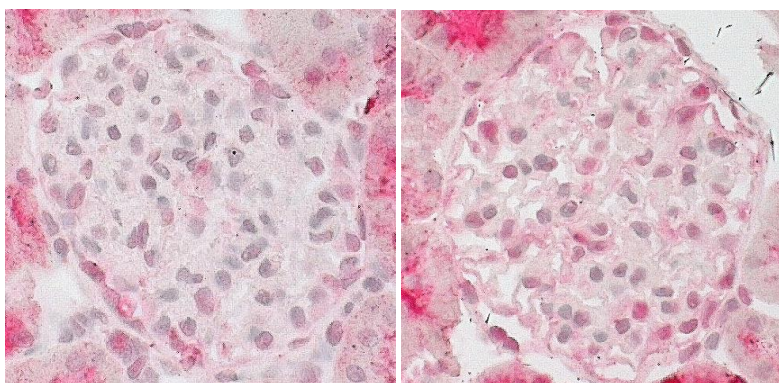


25. ábra SCAI immunfestés kontroll (A) és diabéteszes (B) vesében. A kontroll vese tubulus sejtjeiben (nyilak) intenzív SCAI festődés látható, az interkaláris sejtjeiben még erősebb a festődés. A diabéteszes vese tubulus sejtjeiben (nyilak) gyengébb SCAI festődés látható, de az interkaláris sejtjeiben a festődés itt is intenzív. Alsó ábra: SCAI immunfestés szemikvantitatív kiértékelése. *: $p < 0.01$ vs. Kontroll (Kruskal-Wallis) (Kontroll, $n=4$; Diabéteszes, $n=4$)

Hogy alátámasszuk az elképzelésünket, Western blottal ellenőriztük, hogy fennáll-e a SCAI és az SMA expresszió fordított arányossága a kontroll és beteg vesékben. Ehhez a kontroll és diabéteszes patkányok vese medulláját használtuk fel. A Western blot csökkent SCAI expressziót mutatott ki a diabéteszes patkányokban, mely szignifikáns α -SMA túltermeléssel párosult a Kontrollhoz képest. Tehát fennállt a fordított arányosság a SCAI és az SMA expresszió között (24. ábra).

A kontroll vesék tubulus sejtjeiben intenzívebb sejtmagi SCAI festődés volt látható, mint a diabéteszes vesék tubulus sejtjeiben (25. ábra).

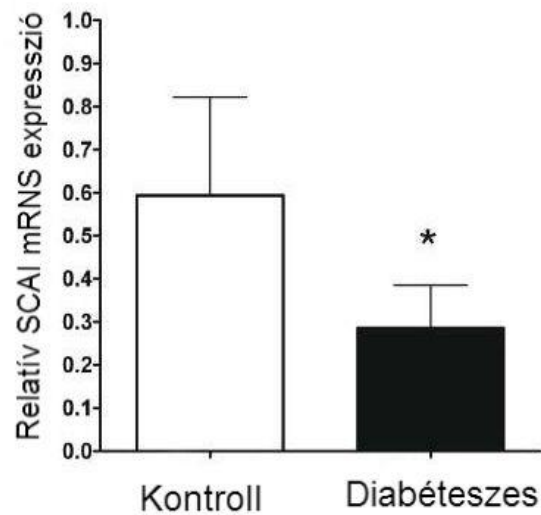
A podociták mindkét csoportban hasonlóan festődtek, bár a diabéteszes glomerulusokban tendenciájában erősebb SCAI festődés volt megfigyelhető, mint a Kontroll csoportban (26. ábra).



26. ábra Kontroll vese (bal oldali) és diabéteszes vese (jobb oldali) reprezentatív glomerulusának SCAI festése. A diabéteszes vese podocitáiban hasonló mértékű a SCAI expresszió a kontrollhoz képest.

4.2.2 Diabéteszes egerek teljes veséjében csökken a SCAI mRNS expressziója

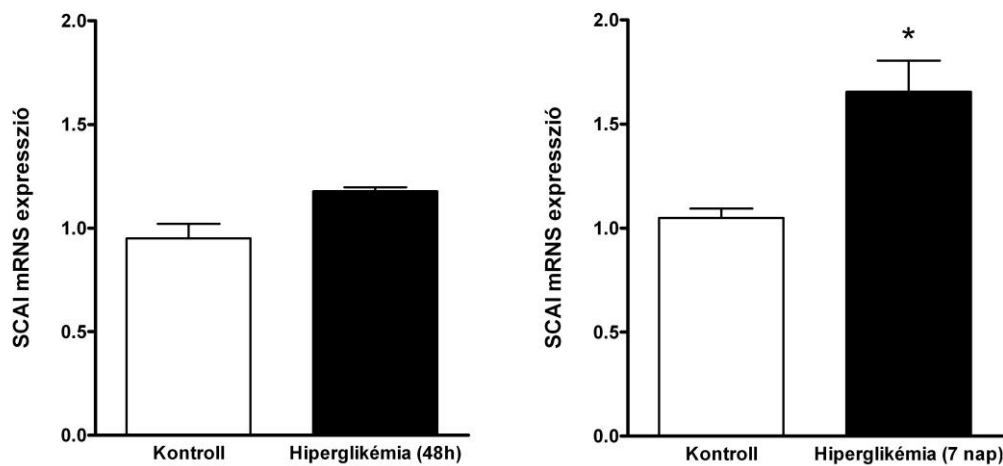
Annak érdekében, hogy ne csak a fehérje, de mRNS expresszióról is képet kapjunk, diabéteszes egerek veséjében megvizsgáltuk a SCAI mRNS expresszió mértékét. A SCAI mRNS expresszió szignifikánsan, mintegy 50%-al alacsonyabb volt a diabéteszes egerek veséjében az egészséges kontroll csoporthoz képest (27. ábra). Ez az eredmény megfelel a diabéteszes patkányok veséjében Western blottal és immunfestéssel talált SCAI fehérje expresszió csökkenésének.



27. ábra Teljes vese SCAI mRNS expresszió csökken diabéteszben. Kruskal-Wallis, * $p=0,01$. (Kontroll, $n=5$; Diabéteszes, $n=3$)

4.2.3 Hiperglikémia hatására fokozódik a podociták SCAI mRNS expressziója *in vitro*

Mivel a glomeruláris, ezen belül is a podocita SCAI immunfestődés tendenciájában erősebb volt diabéteszes patkányokban, a podociták hiperglikémiára adott válaszát *in vitro* is megvizsgáltuk. Egér podocita sejtekben a hiperglikémiás (25 mmol/l glukóz) csoportban 48 óra után enyhén, mintegy 20%-al magasabb SCAI expressziót mértünk, mely 7 nap után még további 40%-al emelkedett a normoglikémiás (5 mmol/l) csoporthoz képest (28. ábra).



28. ábra: Podocita SCAI mRNS expresszió qPCR vizsgálattal. Hiperglikémia hatására a SCAI expresszió 48 óra múlva (bal grafikon) enyhén növekszik, 7 nap elteltével (jobb grafikon) jelentősen megnövekedett *:p<0.05 vs. Normoglikémiás (n=5 plate/csoport)

Összefoglalva az eredményeket, az egészséges vesében jelentős SCAI mRNS és fehérje expressziót találtunk. Diabétesz hatására a renális SCAI génexpresszió, illetve a tubulussejtek SCAI fehérje mennyisége lecsökkent. Ezzel szemben, in vitro körülmények között podocitákban mind korai, mind későbbi hatásként a hiperglikémia növelte a SCAI génexpresszió mértékét.

5 Megbeszélés

A diabéteszes nefropátiában jelenleg használt preventív és terápiás stratégiák ugyan lassítják a vesekárosodás progresszióját, ugyanakkor egyik kezelés sem nyújt megnyugtató védelmet a proteinuria kialakulása illetve a nefropátia progressziója ellen. Emiatt fontos, hogy a pathomechanizmus jobb megértése révén új, kiegészítő terápiákat találjunk a DN progressziójának hatékonyabb lassítása érdekében.

Kísérletünk legfontosabb eredménye, hogy a szelektív PDE5 gátló vardenafil kezelés, amelyet a szérum cGMP szint növekedése is kísér, lassítja a vesekárosodás progresszióját diabéteszes patkánymodellben. A vardenafil napi adagolása a hiperglikémia diagnosztizálásakor kezdődött egy héttel a diabétesz indukció után, és a két hónapon át tartó kezelés végén a vesefunkció kisebb beszűkülése mellett enyhébb szövettani elváltozásokat találtunk a nem kezelt diabéteszes állatokhoz képest.

A DN jellegzetességei közé tartozik az oxidatív stressz, a podocita károsodás és a glomeruloszklerózis. Diabéteszben mindezt emelkedett PDE-5 aktivitás kíséri, és ez a cGMP intenzívebb elbontása révén fokozza az NO-cGMP útvonal diszfunkcióját. A PDE-5 gátlás jótékony hatását kísérletes DN-ban más munkacsoportok is kimutatták nyúlban és patkányban (82,113), de a szelektív PDE5 gátlás podocitákra gyakorolt hatása korábban még nem volt ismert. Kutatásunk elsőként szolgál *in vivo* bizonyítékkal arra, hogy a szelektív PDE-5 gátlás csökkenti T1DM-es patkányok vesekárosodását a podociták intracelluláris cGMP szintjének emelése révén, amelyet a nefrin és podocin expresszió helyreállítása kísér. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a fokozott PDE-5 aktivitás miatt a NO-cGMP útvonal zavarának fontos szerepe lehet a podocita károsodás patomechanizmusában.

A vardenafil egy szelektív PDE-5 inhibitor, amely a cGMP lebontásának gátlása révén az NO-függő cGMP szintet emeli. Sikeresen alkalmazták a vardenafilt cukorbeteg erektilis diszfunkciójának gyógyításában (165), a podocitákra kifejtett hatását azonban még nem vizsgálták. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy cukorbetegségben a csökkent NO termelés hozzájárul a glomeruláris károsodáshoz, ezek molekuláris mechanizmusa viszont még nem ismert (166). Az egyik legerősebb profibrotikus hatással rendelkező citokin, a TGF- β 1 fontos szerepet játszik a glomeruloszklerózis progressziójában (167,168), amely során az extracelluláris mátrix alkotóelemei, mint például a fibronectin, felhalmozódnak (169,170). A mezangiális

sejtekben a hiperglikémia látens TGF- β 1 (171) és trombospondin-1 (TSP-1, látens TGF- β 1 aktivátor molekula) (172) képződését idézi elő. Kísérletünkben vardenafil hatására csökkent a mezangiális expanszió, a tubuláris károsodás, valamint a TGF- β 1 és a fibronectin expresszió. Ezek egybehangzó eredmények Kuno és mtsai. szildenafilnal végzett kísérletével 2-es típusú diabéteszes patkánymodellen (113).

Egyre több kutatási eredmény utal arra, hogy a podocitáknak fontos szerepük van a DN patogenezisében (40,173). A magas vércukorszint által stimulált podociták serkenthetik a mezangiális sejtekben az AngII-függő TGF- β 1 expressziót (40),(174). A podociták TGF- β 1 termelését az albumin közvetlenül indukálja (175), míg a hiperglikémia fokozza a podociták TGF- β 1-re való érzékenységet (176) és a podociták TSP-1 termelését (177). A mezangiális sejtek extracelluláris mátrixában tárolódó, fibrillinhez vagy a látens TGF- β kötő fehérjéhez (LTBP-hez) kapcsolódó inaktív TGF- β 1 eképp aktiválódhatnak a podociták által termelt TSP-1 hatására. A diabéteszben kialakuló mezangiális TGF- β 1 túltermelés (171,176,178) pedig visszahat a podocitákra, annak károsodását, pusztulását (179), illetve apoptózisát (180) okozva.

Diabéteszben a podociták citoszkeletonja, illetve a lábnyúlványok morfológiája megváltozik, amely csökkent nefrin és podocin expresszióval jár együtt (40,173). A nefrin és a podocin a lábnyúlványok közötti résmembrán fontos elemei, és csökkenésük hozzájárul a patológiás filtrációhoz, a proteinuria kialakulásához (181,182). Kísérletünkben csökkent nefrin és podocin expressziót, illetve szignifikáns proteinuriát találtunk a kezeletlen diabéteszes patkányok veséjében, miközben a vardenafil kezelés helyreállította a nefrin és podocin expressziót, és jelentősen csökkentette a proteinuriát. A vardenafil podocitákra kifejtett in vivo jótékony hatásának hátterében felvetődik az immunfestés során kimutatott intracelluláris cGMP szint megemelkedésének jelentősége. Az endoteliális cGMP immunreaktivitás a glomerulusokban csak minimálisan változott vardenafil hatására, ha összevetjük a podocitákban talált eredményekkel, feltételezhetően elhanyagolható szerepe lehetett a vardenafil glomeruláris hatásaiban. Podocitákban a cGMP szabályozza a filtrációs barriert a résmembrán modulációja és a citoszkeletális fehérjék reorganizációja révén (27,183). Mezangiális sejtekben a cGMP-dependens protein kináz (PKG) gátolja a glukóz-indukálta TSP-1 expressziót (184), továbbá leírták a vardenafilról, hogy anti-Thy1 nefritikus egerekben csökkenti a TSP-1 expressziót (185). Így a diabéteszben

tapasztható csökkent cGMP szint fontos szerepet játszhat a podocita károsodás, a csökkent nefrin és podocin expresszió, illetve a proteinuria kialakulásában. A podociták cGMP szintjének fenntartása, úgy véljük, szignifikánsan hozzájárul a nefrin és podocin expresszió helyreállításához. Továbbá, a keringő és az intracelluláris (podocita) cGMP szintek helyreállítása csökkentheti a látens TGF- β 1 aktivációját a glomerulusokban, amit a csökkent glomeruláris TGF- β 1 immunfestődés is mutatott.

A PDE-5 gátlás potenciális gyulladáscsökkentő, anti-oxidatív vagy hemodinamikai úton is javíthatja a diabéteszes nefropátia kimenetelét. Kísérletes vesetömeg csökkentést követően kimutatták, hogy szildenafil –egy másik PDE-5 inhibitor– csökkenthető a gyulladással infiltráció és az oxidatív stressz (79). Azonban a mi kísérletünkben a vardenafil nem befolyásolta a mononukleáris sejt infiltrációt. Egyrészt modellünkben a tubulointersticiális infiltráció nem volt szignifikáns a kezeletlen diabéteszes csoportban. Másrészt lehetséges, hogy a különböző PDE-5 inhibitorok különbözőképpen hatnak a gyulladásra (186). Ezt támasztja alá Hohenstein és mksai. kísérlete, amelyben a vardenafil kezelés nem befolyásolta a renális lobsejt infiltrációt kísérletes glomerulonefritiszben (185).

Nemcsak a magas vércukorszint, hanem a cukorbetegségben képződő reaktív oxigén gyökök is hozzájárulhatnak a podociták fokozott AngII termeléséhez (40), amely szintén a mezangiális TGF- β fokozott termeléséhez vezet. Az intracelluláris cGMP felhalmozódásról leírták, hogy csökkenti az oxidatív károsodást diabéteszben (186), illetve a szildenafil kezelés csökkenti a szuperoxid képződést (187). Ezért feltételeztük, hogy a vardenafil is csökkentheti az oxidatív stressz mértékét a vesében, illetve a lipidperoxidációt a keringésben. Elvárásainkkal ellentétben nem tudtuk bizonyítani a vardenafil antioxidáns hatását modellünkben. Sem a szérumban TBARS koncentráció, sem pedig a renális nitrotyrozinnal immunfestés nem mutatott szignifikáns különbséget a kezelt és kezeletlen diabéteszes csoportokban.

PDE-5 gátlás hatására feltételezhetjük azt is, hogy hemodinamikai változások zajlanak a vesében. Feltettük a kérdést, hogy vajon a megváltozott cGMP szintek befolyásolják-e a vérnyomást, illetve ennek következményeként volt-e hatással a vesekárosodásra. Kísérletünkben az átlagos artériás vérnyomás (MAP) értékek nem változtak számottevően a kezelt és kezeletlen csoportokban.

A nitrogén monoxid vazodilatációt okoz az afferens arteriolákban (188). Számos tanulmány leírja a NO csökkent termelődését diabéteszes nefropátiában. STZ-diabéteszes patkányokban megelőzhetőnek találták a diabéteszben kialakuló hiperfiltrációt és csökkenthetőnek találták a proteinuriát egy NO prekursor, L-arginin adagolásával (189). Továbbá, az étrend hosszútávú kiegészítése argininnel fokozta az NO termelést, és elősegítette a vesefunkció megőrzését szintén STZ-diabéteszes patkányokban (190). Másrészt pedig Kamijo és mtsai. azt találták, hogy L-arginin nem befolyásolta a glomeruláris filtrációt 2-es típusú diabéteszben (191). A PDE5 inhibitorok hatásairól is ellentmondó eredmények születtek a glomeruláris filtráció tükrében. A szildenafilről leírták, hogy csökkenti a hiperfiltrációt 2-es típusú diabéteszben (113). Lau és mtsai. kísérletében (82) azonban a vardenafil kezelés nem befolyásolta a hiperfiltrációt diabéteszes nyulakban. Kísérletünkben nem zárható ki, hogy a vardenafil kezelés a hiperfiltráció befolyásolásával együtt javította a diabéteszes nefropátia progresszióját, azonban ilyen jellegű mérési adatok nem állnak rendelkezésünkre. Eredményeink alapján nem egyértelmű, hogy miként hatott a vardenafil kezelés hemodinamikai paraméterekre a diabéteszes vesében. Azonban, a vardenafil kezelés során a podociták megemelkedett intracellulárisan cGMP tartalma és diabéteszes nefropátiában megfigyelt jótékony hatások világosan kitűnnek vizsgálatainkból.

Megállapítjuk, hogy STZ-diabétesz modellünkben a PDE-5 farmakológiai gátlása vardenafillal megemelte a keringő cGMP szinteket, megőrizte a podociták intracelluláris cGMP szintjét és a podocita működést a nefrin és podocin expressziók fenntartása által. A szelektív PDE-5 gátlás DN progresszióban megfigyelt jótékony hatásai függetlenek voltak a vérnyomás és a nitro-oxidatív stressz mértékétől. Kísérleti eredményünk a podocitákat olyan célsejteként határozza meg, amelyekben az NO-cGMP tengely károsodást szenved diabéteszben. Megfigyelésünk alapján, mely szerint a podociták cGMP szintjének helyreállítása jótékony hatású 1-es típusú diabéteszben felmerülhet a vardenafil bevonása a DN kiegészítő terápiájában.

A SCAI egy újonnan azonosított fehérje, amelynek működését eddig csak invazív rákos folyamatokban írták le. A rákos folyamatok során fokozott MRTF és β 1-integrin expressziót szoros összefüggésbe hozták a SCAI fehérje csökkenésével.

Feltételezhetően a SCAI szabályozás sérül és emiatt nő extrém mértékben a fibrózishoz fontos MRTF és a sejtmigrációhoz szükséges $\beta 1$ -integrin fehérjék expressziója (117). Kísérletünkben a renális SCAI expressziót 1-es típusú diabétesz mellitusz *in vivo* patkány és egér modellen, valamint *in vitro* podocita sejtenyészetben vizsgáltuk. Feltételezésünk szerint a SCAI expresszió diabéteszben is változik, mivel az MRTF-ek szerepe jelentős a diabéteszben kialakuló vesefibrózisban, még hozzá a miofibroblasztok α -SMA expressziójának aktiválásához.

Fiziológiás állapot esetén a sejtmagban működő SCAI gátolja az MRTF- és SRF-dependens α -SMA promoter aktivációt. Diabéteszben azonban fokozódik a TGF- $\beta 1$ és a kis GTPázok jelátviteli útvonalának aktivációja (192,193), az emelkedett TGF- $\beta 1$ szint pedig serkenti az α -SMA expressziót (194), végül a SCAI α -SMA-t gátló hatása nem érvényesül a miofibroblasztokban, illetve fibrózisban. Eredményünk szerint diabéteszes nefropátiában, miközben fokozódott az extracelluláris mátrix mennyisége és megnövekedett α -SMA fehérje expresszió, csökkent renális SCAI mRNS és fehérje expressziót figyeltünk meg. SCAI hiányában fokozódott az α -SMA expresszió, amely a miofibroblasztok, ezáltal vesefibrózis markere.

Sejtszinten a SCAI expresszió változása azonban eltéréseket mutatott. Diabéteszes vese SCAI immunfestése során a tubulusokban csökkent intenzitást, a glomerulusban azonban változatlan SCAI fehérje expressziót tapasztaltunk a kontrollhoz képest. *In vitro* a podocitákban magasabb SCAI génexpressziót mértünk hiperglikémiás körülmények között. Az eltérő SCAI mintázat az eltérő sejtkárosodási mechanizmusokra utal diabéteszben. Mindez egybehangzik Essawy és mtsai. eredményeivel, miszerint az α -SMA expresszió főként az tubulointerstíciumban jelentkezik diabéteszes nefropátia során, és a glomerulusokban csak kisebb mértékben (195). A podocitákban nem jellemző az α -SMA expresszió, viszont a $\beta 1$ -integrin fontos szerepet játszik a podociták fiziológiás morfológiájának megőrzésében (126) (139). A csökkent $\beta 1$ -integrin expresszió hozzájárul a podociták leválásához a GBM-ről, amely közvetlenül rontja a glomerulus filtrációt, és proteinuria kialakulását segíti elő. Brandt és mtsai. (117) a SCAI és az integrinek szoros kapcsolatát írta le kísérletünkben, miszerint rákos folyamatban a nagymértékben megnövekedett $\beta 1$ -integrin expresszió a SCAI expresszió csökkenésével jár együtt. Ezzel szemben modellünkben a podociták SCAI expressziója fokozódott hiperglikémia hatására. Ez az eredmény magyarázható a

podociták feltételezhetően csökkent β 1-integrin expressziójával hiperglikémiás körülmények között, mint ahogy azt korábban leírták a podociták diabéteszes modelljében (137) (138). Eredményünk egybehangzik Brandt és mksai. állításával, amennyiben a β 1-integrin és a SCAI expresszió fordítottan aránylik egymáshoz, ezúttal azonban a SCAI növekedett a vélhetően alacsonyabb β 1-integrin szint mellett. További kísérletek szükségesek azonban a podociták SCAI - β 1-integrin relációjának feltérképezéséhez.

6 Következtetések

A diabéteszes nefropátia patomechanizmusa multifakoriális. Amikor a progresszió végállapotú veseelégtelenségbe torkollik, a betegek életminősége és életkilátásai drasztikusan romlanak. Élethosszig tartó vesepótló kezelésnek, dialízisnek vagy transzplantációnak kell alávetniük magukat, amely végleg meghatározza a betegek életét, az általában mellette fennálló társbetegségekkel együtt. A nefropátia kivédésének, a progresszió lassításának új, hatékonyabb lehetőségei ezért fontos életminőségbeli, epidemiológiai és gazdasági haszonnal járhatnak.

A kísérletünk és az irodalmi adatok alapján a fokozott PDE-5 aktivitásnak fontos szerepe lehet diabéteszes nefropátia progressziójában. Elsőként írhattuk le, hogy a PDE-5 szelektív gátlása a cGMP szint emelése révén célzottan védelmező hatást fejt ki a podocitákra diabéteszes körülmények között patkányban. Az egészséges illetve károsodott podocitákban zajló molekuláris mechanizmusok jobb megértése hozzájárulhat a proteinuria, illetve a progresszív vesebetegségek hatékonyabb kezeléséhez. Állatmodellünk alapján érdemes lehet tehát a szelektív PDE-5 gátlók klinikai alkalmazhatóságát is vizsgálni diabéteszes vesebetegség kiegészítő terápiájaként.

A diabéteszes nefropátia patomechanizmusában a korábban nem ismert SCAI fehérje expresszióját is vizsgáltuk egészséges és diabéteszes vesében, in vivo és in vitro. Kísérletünkben az egészséges vese jelentős SCAI mRNS és fehérje expressziót mutatott, míg diabétesz hatására a teljes vese, illetve a tubulussejtek tekintetében a SCAI expresszió lecsökkent, a podocitákban viszont fokozódott. A SCAI expresszió kizárólag alfa-SMA termelő tubulussejtekben csökkent, amelyek összefüggésbe hozhatók a miofibroblasztok kialakulásával. Érdemes lenne megvizsgálni, hogy a SCAI expresszió serkentése diabéteszben csökkentené-e az EMT kialakulását, esetleg biztosíthat-e egyfajta endogén védelmet vesefibrózis ellen.

7 Összefoglalás

A diabéteszes nefropátia gyakorisága világszerte exponenciálisan nő, a prevenció illetve terápiája nem megoldott, ezért patomechanizmusának részletesebb feltárása szükséges.

Diabéteszben többek közt károsodik a nitrogén-monoxid - ciklikus guanozin monofoszfát (NO-cGMP) tengely és fokozódik a foszfodiészteráz-5 (PDE-5) aktivitás. A kísérletünk és az irodalmi adatok alapján a fokozott PDE-5 aktivitásnak fontos szerepe lehet diabéteszes nefropátia progressziójában. Az erektilis diszfunkció kezelésében széles körben elterjedt PDE-5 gátló vardenafil korábban ismeretlen farmakológiai hatását vizsgáltuk vesében diabéteszes körülmények között. A podociták a vese glomeruláris filtrációs barrierjének fontos szerkezeti elemei. Eredményeink alapján a PDE-5 szelektív gátlása a cGMP szint emelése révén célzottan védelmező hatást fejtett ki a vese podocitáira diabéteszben. Az egészséges illetve károsodott podocitákban zajló molekuláris mechanizmusok jobb megértése hozzájárulhat a diabéteszes nefropátia hatékonyabb kezeléséhez.

A diabéteszes nefropátia, illetve a podociták jobb megértése céljából egy újonnan leírt fehérje, a SCAI (suppressor of cancer cell invasion, rákos sejtek invázióját szuprimáló molekula) expresszióját is vizsgáltuk diabéteszben in vivo és in vitro. Jelenleg a SCAI-ról nagyon kevés adat áll még rendelkezésre. A SCAI szorosan hat az integrinek működésére, minthogy SCAI hiányában extrém mértékben nő a β 1-integrin gén expressziója. Ezért feltételezésünk szerint nemcsak a rák, hanem a fibrózis patomechanizmusában is szerepe lehet. Kísérletünk eredményei szerint diabétesz hatására a tubulussejtek SCAI expressziója lecsökken, azonban a podocitákban fokozódik. Ez felveti, hogy a vesén belül sejttípusonként eltérő lehet a SCAI szabályozása diabéteszes nefropátiában. Az eddigi eredmények azt sugallják, hogy a SCAI a fiziológiás védekező mechanizmusban vesz részt.

8 Summary

The incidence of diabetic nephropathy (DN) is increasing worldwide, but the prevention and therapy has not yet been resolved satisfactorily, and a number of researches is taking place to understand its detailed pathomechanism.

DN is characterized by impaired nitric oxide - cyclic guanosine monophosphate (NO-cGMP) axis and increased phosphodiesterase-5 (PDE5) activity, among others. Based on our experiment and literature data PDE5 activity may play an important role in the progression of DN. The widely used PDE5 inhibitor in the treatment of erectile dysfunction, Vardenafil, was investigated for its previously unknown pharmacological effect on podocytes under diabetic conditions. The podocytes are important structural components of glomerular filtration barrier in the kidney. The present study provides the first in vivo evidence that pharmacological treatment with a selective PDE-5 inhibitor, Vardenafil attenuates renal damage in type 1 diabetic rats by raising intracellular cGMP content of podocytes. Deeper understanding of podocytes provides new hope in the therapy of proteinuria and progressive renal diseases. Our results might suggest the possible use of vardenafil as a new regimen in the treatment of DN.

For the better understanding of diabetic nephropathy we examined a newly described protein, SCAI (suppressor of cancer cell invasion) and its previously unknown expression in the diabetic kidney in vivo and in vitro. SCAI expression strongly correlates with the functioning of integrins, as the expression of $\beta 1$ -integrin is extremely increased in the lack of SCAI, therefore, we suggest that it has a role not only in cancer, but in the pathomechanism of fibrosis as well. We found that SCAI expression decreased in the whole kidney and tubular cells, but showed an increasing tendency in podocytes under diabetic conditions. The expected decrease of SCAI expression in podocytes did not occur. This suggests that SCAI regulation may vary in different cell types in the diabetic kidney. Currently, very little data is available about SCAI. The results so far suggest that SCAI is involved in the physiological defence mechanism.

9 Irodalomjegyzék

1. Meyer TW, Bennett PH, and Nelson RG. (1999) Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 42: 1341-1344
2. Steffes MW, Schmidt D, McCreery R, Basgen JM, and International Diabetic Nephropathy Study G. (2001) Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney international* 59: 2104-2113
3. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, and Bottinger EP. (2006) Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 55: 225-233
4. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, and Meyer TW. (1997) Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *The Journal of clinical investigation* 99: 342-348
5. Belgyógyászati Szakmai Kollégium Magyar Diabetes Társaság. *Egészségügyi Közlöny* 21. szám. Magyar Közlöny Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 2010: 2934
6. ERA-EDTA Registry 2004 Annual Report, Academic Medical Center, Department of Medical Informatics, Amsterdam, 2006: 1-121 <http://www.era-edta-reg.org/index.jsp?p=14>
7. United States Renal Data System 2007 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2007:11 <http://www.usrds.org/atlas07.aspx>
8. United States Renal Data System 2012 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2012:14 <http://www.usrds.org/atlas12.aspx>
9. Kulcsár I, Szegedi, J, Ladányi, E, Török, M, Túri, S, Kiss, I. (2010) Dialíziskezelés Magyarországon: 2003-2009. *Hypertonia és Nephrologia* 14: 247-253

10. United States Renal Data System 2008 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD 2008:22 <http://www.usrds.org/atlas08.aspx>
11. Ritz E. (2006) Diabetic nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 17: 481-490
12. Mogensen CE. (1997) How to protect the kidney in diabetic patients: with special reference to IDDM. *Diabetes* 46: S104-111
13. Osterby R. (1986) Structural changes in the diabetic kidney. *Clin Endocrinol Metab* 15: 733-751
14. Rudberg S, and Osterby R. (1997) Decreasing glomerular filtration rate--an indicator of more advanced diabetic glomerulopathy in the early course of microalbuminuria in IDDM adolescents? *Nephrol Dial Transplant* 12: 1149-1154
15. Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive Clinical Nephrology*. Harcourt Publishers Ltd., San Diego, 2000: 34.32 - 34.33
16. Vora JP, Dolben J, Dean JD, Thomas D, Williams JD, Owens DR, and Peters JR. (1992) Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 41: 829-835
17. Johnson RJ. (1997) Have we ignored the role of oncotic pressure in the pathogenesis of glomerulosclerosis? *Am J Kidney Dis* 29: 147-152
18. Vora JP, Dolben J, Williams JD, Peters JR, and Owens DR. (1993) Impact of initial treatment on renal function in newly-diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 734-740
19. Ruggenenti P, and Remuzzi G. (2000) Nephropathy of type 1 and type 2 diabetes: diverse pathophysiology, same treatment? *Nephrology, dialysis, transplantation* 15: 1900-1902
20. White KE, and Bilous RW. (2000) Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 1 disease. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 11: 1667-1673
21. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, Ferrario F, Fogo AB, Haas M, de Heer E, Joh K, Noel LH, Radhakrishnan J, Seshan SV, Bajema IM, Bruijn JA, and Renal Pathology S. (2010) Pathologic

- classification of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 21: 556-563
22. Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive Clinical Nephrology*. Harcourt Publishers Ltd, San Diego, 2000: 34.36 - 34.37
 23. Kiryu K, Morita H, Fujita Y, Kawasumi M, Shinzato T, Tsuruta Y, Nakai S, and Maeda K. (1994) Phenotypic expressions of type I, III, IV, V, and VI collagens in patients with diabetic nephropathy: immunohistochemical comparison between HD and non-HD patients. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 36: 365-373
 24. Zhou C, Yool AJ, Nolan J, and Byard RW. (2013) Armanni-Ebstein lesions: a need for clarification. *Journal of forensic sciences* 58: S94-98
 25. Kretzler M. (2002) Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane. *Microscopy research and technique* 57: 247-253
 26. Kojima K, and Kerjaschki D. (2002) Is podocyte shape controlled by the dystroglycan complex? *Nephrology, dialysis, transplantation* 17 S9: 23-24
 27. Pavenstadt H. (2000) Roles of the podocyte in glomerular function. *American journal of physiology. Renal physiology* 278: F173-179
 28. Tryggvason K. (1999) Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 10: 2440-2445
 29. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, Skoglund U, Obrink B, Wartiovaara J, and Tryggvason K. (2003) Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *The American journal of pathology* 163: 2337-2346
 30. Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P, and Mathieson PW. (2002) Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *The American journal of pathology* 161: 1459-1466
 31. Michaud JL, and Kennedy CR. (2007) The podocyte in health and disease: insights from the mouse. *Clinical science* 112:325-335
 32. Haraldsson B, Nystrom J, and Deen WM. (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological reviews* 88: 451-487

33. Patrakka J, and Tryggvason K. (2009) New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nature reviews. Nephrology* 5: 463-468
34. Haraldsson B, and Jeansson M. (2009) Glomerular filtration barrier. *Current opinion in nephrology and hypertension* 18: 331-335
35. Jefferson JA, Alpers CE, and Shankland SJ. (2011) Podocyte biology for the bedside. *American journal of kidney diseases* 58: 835-845
36. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, and St John PL. (2009) Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 20: 1471-1479
37. Ziyadeh FN, and Wolf G. (2008) Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Current diabetes reviews* 4: 39-45
38. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, and Mundel P. (2004) Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 113: 1390-1397
39. White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, Piras G, De Cosmo S, and Viberti G. (2002) Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 51: 3083-3089
40. Wolf G, Chen S, and Ziyadeh FN. (2005) From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 54: 1626-1634
41. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, and Koide H. (2000) Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation* 15: 1379-1383
42. Toyoda M, Najafian B, Kim Y, Caramori ML, and Mauer M. (2007) Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration in human type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes* 56: 2155-2160
43. Gilbert RE, Tsalamandris C, Bach LA, Panagiotopoulos S, O'Brien RC, Allen TJ, Goodall I, Young V, Seeman E, Murray RM, and et al. (1993) Long-term glycemic control and the rate of progression of early diabetic kidney disease. *Kidney Int* 44: 855-859

44. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) The effect of intensive treatment on development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986
45. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, and Huang GD. (2009) Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 360: 129-139
46. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial (2003) Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 290: 2159-2167
47. Parving HH, Andersen AR, Smidt UM, Hommel E, Mathiesen ER, and Svendsen PA. (1987) Effect of antihypertensive treatment on kidney function in diabetic nephropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 294: 1443-1447
48. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1997: 157, 2413-2446
49. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Woodward M, Billot L, Harrap S, Poulter N, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee DE, Hamet P, Heller S, Liu LS, Mancia G, Mogensen CE, Pan CY, Rodgers A, and Williams B. (2007) Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 829-840
50. Cushman WC. (2007) What should our blood pressure goal be in patients with diabetes? *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9: 823-826
51. Remuzzi G, Perico N, Macia M, and Ruggenenti P. (2005) The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, S57-65
52. Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, Motomiya Y, Bucala R, Iida S, Tamaki K, Imaizumi T, Cooper ME, and Okuda S. (2004)

- AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int* 66: 2137-2147
53. Barit D, and Cooper ME. (2008) Diabetic patients and kidney protection: an attainable target. *J Hypertens Suppl* 26, S3-7
 54. Weir MR. (2009) The renoprotective effects of RAS inhibition: focus on prevention and treatment of chronic kidney disease. *Postgrad Med* 121, 96-103
 55. Arici M, and Erdem Y. (2009) Dual blockade of the renin-angiotensin system for cardiorenal protection: an update. *Am J Kidney Dis* 53: 332-345
 56. Epstein M, Williams GH, Weinberger M, Lewin A, Krause S, Mukherjee R, Patni R, and Beckerman B. (2006) Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 940-951
 57. 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, and Fekete A. (2012) Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *PLoS one* 7, e39938
 58. Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Rossing P, Hollenberg NK, and Parving HH. (2012) Impact of glycaemic control on the effect of direct renin inhibition in the AVOID study. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 13: 250-253
 59. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJV, De Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, Chaturvedi N, Persson F, Desai AS, Nicolaidis M, Richard A, Xiang Z, Brunel P, Pfeffer MA (2012) Cardiorenal End Points in a Trial of Aliskiren for Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 367:2204-2213
 60. Christiansen JS. (1978) Cigarette smoking and prevalence of microangiopathy in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1: 146-149
 61. Biesenbach G, Grafinger P, Janko O, and Zazgornik J. (1997) Influence of cigarette-smoking on the progression of clinical diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Nephrol* 48: 146-150
 62. Zeller KR, and Jacobson H. (1989) Reducing dietary protein intake to retard progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 13: 17-19

63. Tonolo G, Ciccarese M, Brizzi P, Puddu L, Secchi G, Calvia P, Atzeni MM, Melis MG, and Maioli M. (1997) Reduction of albumin excretion rate in normotensive microalbuminuric type 2 diabetic patients during long-term simvastatin treatment. *Diabetes Care* 20, 1891-1895
64. Miyata T, and Dan T. (2008) Inhibition of advanced glycation end products (AGEs): an implicit goal in clinical medicine for the treatment of diabetic nephropathy? *Diabetes Res Clin Pract* 82 Suppl 1, S25-29
65. Tuttle KR. (2008) Protein kinase C-beta inhibition for diabetic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract* 82 Suppl 1, S70-74
66. Kristova V, Liskova S, Sotnikova R, Vojtko R, and Kurtansky A. (2008) Sulodexide improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Physiol Res* 57: 491-494
67. Sachidanandam K, Elgebaly MM, Harris AK, Hutchinson JR, Mezzetti EM, Portik-Dobos V, and Ergul A. (2008) Effect of chronic and selective endothelin receptor antagonism on microvascular function in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2743-2749
68. Peng F, Wu D, Gao B, Ingram AJ, Zhang B, Chorneyko K, McKenzie R, and Krepinsky JC. (2008) RhoA/Rho-kinase contribute to the pathogenesis of diabetic renal disease. *Diabetes* 57: 1683-1692
69. Lee HB, Noh H, Seo JY, Yu MR, and Ha H. (2007) Histone deacetylase inhibitors: a novel class of therapeutic agents in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*, S61-66
70. Forbes JM, Fukami K, and Cooper ME. (2007) Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 115: 69-84
71. Giunti S, Barit D, and Cooper ME. (2006) Mechanisms of diabetic nephropathy: role of hypertension. *Hypertension* 48: 519-526
72. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, and Diez J. (2001) Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrology, dialysis, transplantation* 16 Suppl 1, 2-5

73. Bredt DS, and Snyder SH. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry* 63: 175-195
74. Yan C, Kim D, Aizawa T, and Berk BC. (2003) Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: 26-36
75. Firoozi F, Longhurst PA, and White MD. (2005) In vivo and in vitro response of corpus cavernosum to phosphodiesterase-5 inhibition in the hypercholesterolaemic rabbit. *BJU international* 96: 164-168
76. Briganti A, Salonia A, Gallina A, Sacca A, Montorsi P, Rigatti P, and Montorsi F. (2005) Drug Insight: oral phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *Nature clinical practice. Urology* 2: 239-247
77. Redrow GP, Thompson CM, and Wang R. (2014) Treatment strategies for diabetic patients suffering from erectile dysfunction: an update. *Expert opinion on pharmacotherapy* 15: 1827-1836
78. Dousa TP. (1999) Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney international* 55: 29-62
79. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, and Vaziri ND. (2005) Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney international* 68: 2131-2142
80. Cui W, Maimaitiyiming H, Qi X, Norman H, Zhou Q, Wang X, Fu J, and Wang S. (2014) Increasing cGMP-dependent protein kinase activity attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *American journal of physiology. Renal physiology* 306: F996-1007
81. Hall G, Rowell J, Farinelli F, Gbadegesin RA, Lavin P, Wu G, Homstad A, Malone A, Lindsey T, Jiang R, Spurney R, Tomaselli GF, Kass DA, and Winn MP. (2014) Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiotensin II-induced podocyte dysmotility via the protein kinase G-mediated downregulation of TRPC6 activity. *American journal of physiology. Renal physiology* 306: F1442-1450
82. Lau DH, Mikhailidis DP, and Thompson CS. (2007) The effect of vardenafil (a PDE type 5 inhibitor) on renal function in the diabetic rabbit: a pilot study. *In vivo* 21: 851-854

83. Dousa TP. (1998) Signaling role of PDE isozymes in pathobiology of glomerular mesangial cells. Studies in vitro and in vivo. *Cell Biochem Biophys* 29: 19-34
84. Lledo-Garcia E, Rodriguez-Martinez D, Cabello-Benavente R, Moncada-Iribarren I, Tejedor-Jorge A, Dulin E, Hernandez-Fernandez C, and Del Canizo-Lopez JF. (2007) Sildenafil improves immediate posttransplant parameters in warm-ischemic kidney transplants: experimental study. *Transplant Proc* 39: 1354-1356
85. Cheng J, and Grande JP. (2007) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: novel therapeutic agents for progressive renal disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 38-51
86. Houslay MD. (2001) PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 69: 249-315
87. Gyires K., Fürst Zs. *Farmakológia és farmakoterápia I. Farmakológia. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest, 2007: 169*
88. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, and Champion HC. (2007) Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res* 75: 303-314
89. Thomas MK, Francis SH, and Corbin JD. (1990) Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem* 265: 14971-14978
90. Schalkwijk CG, Liew-a-Fa M, van Hinsbergh VW, and Stehouwer CD. (2002) Pathophysiological role of Amadori-glycated proteins in diabetic microangiopathy. *Semin Vasc Med* 2: 191-197
91. Sharma K, Jin Y, Guo J, and Ziyadeh FN. (1996) Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45: 522-530
92. Ballermann BJ, and Marsden PA. (1991) Endothelium-derived vasoactive mediators and renal glomerular function. *Clin Invest Med* 14: 508-517
93. Felaco M, Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Libertini N, Taccardi AA, Di Napoli P, Di Giulio C, Barbacane R, and Conti P. (2001) Endothelial nitric

- oxide synthase (eNOS) expression and localization in healthy and diabetic rat hearts. *Annals of clinical and laboratory science* 31: 179-186
94. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, and Szabo C. (2005) Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 12: 267-275
 95. Sego S. (2007) Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Nephrol Nurs J* 34: 631-633
 96. Witte K, Jacke K, Stahrenberg R, Arlt G, Reitenbach I, Schilling L, and Lemmer B. (2002) Dysfunction of soluble guanylyl cyclase in aorta and kidney of Goto-Kakizaki rats: influence of age and diabetic state. *Nitric oxide : biology and chemistry* 6: 85-95
 97. Craven PA, Studer RK, and DeRubertis FR. (1994) Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest* 93: 311-320
 98. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, and Beavo JA. (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93: 280-291
 99. Lin CS, Xin ZC, Lin G, and Lue TF. (2003) Phosphodiesterases as therapeutic targets. *Urology* 61: 685-691
 100. Eros D, Szantai-Kis C, Kiss R, Keri G, Hegymegi-Barakonyi B, Kovesdi I, and Orfi L. (2008) Structure -activity relationships of PDE5 inhibitors. *Curr Med Chem* 15: 1570-1585
 101. Lin CS. (2004) Tissue expression, distribution, and regulation of PDE5. *Int J Impot Res* 16 Suppl 1: S8-S10
 102. Speakman MT, and Kloner RA. (1999) Viagra and Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 4: 259-267
 103. Beavo JA. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75: 725-748
 104. Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, and Degerman E. (1995) Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys* 322: 1-13

105. Conti M, Nemoz G, Sette C, and Vicini E. (1995) Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endocr Rev* 16: 370-389
106. Zhang R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, and Chopp M. (2002) Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 33: 2675-2680
107. Chiu YJ, and Reid IA. (2002) Effect of sildenafil on renin secretion in human subjects. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 620-625
108. D'Amati G, di Gioia CR, Bologna M, Giordano D, Giorgi M, Dolci S, and Jannini EA. (2002) Type 5 phosphodiesterase expression in the human vagina. *Urology* 60: 191-195
109. Ukita T, Nakamura Y, Kubo A, Yamamoto Y, Takahashi M, Kotera J, and Ikeo T. (1999) 1-Arylnaphthalene lignan: a novel scaffold for type 5 phosphodiesterase inhibitor. *J Med Chem* 42: 1293-1305
110. Bender AT, and Beavo JA. (2004) Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. *Neurochem Int* 45: 853-857
111. Matousovich K, Tsuboi Y, Walker H, Grande JP, and Dousa TP. (1997) Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes block renal tubular cell proliferation induced by folic acid. *J Lab Clin Med* 130: 487-495
112. Ghali-Ghoul R, Tahseldar-Roumieh R, and Sabra R. (2007) Effect of chronic administration of sildenafil on sodium retention and on the hemodynamic complications associated with liver cirrhosis in the rat. *Eur J Pharmacol* 572: 49-56
113. Kuno Y, Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, and Akizawa T. (2011) Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, attenuates diabetic nephropathy in non-insulin-dependent Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *British journal of pharmacology* 162: 1389-1400
114. Thompson CS. (2013) Diabetic nephropathy: Treatment with phosphodiesterase type 5 inhibitors. *World journal of diabetes* 4: 124-129
115. Brosius FC, Khoury CC, Buller CL, and Chen S. (2010) Abnormalities in signaling pathways in diabetic nephropathy. *Expert review of endocrinology & metabolism* 5: 51-64

116. Xiao L, Wang M, Yang S, Liu F, and Sun L. (2013) A glimpse of the pathogenetic mechanisms of Wnt/beta-catenin signaling in diabetic nephropathy. *BioMed research international* 2013: 987064
117. Brandt DT, Baarlink C, Kitzing TM, Kremmer E, Ivaska J, Nollau P, and Grosse R. (2009) SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin. *Nature cell biology* 11: 557-568
118. Chen X, Hu W, Xie B, Gao H, Xu C, and Chen J. (2014) Downregulation of SCAI enhances glioma cell invasion and stem cell like phenotype by activating Wnt/beta-catenin signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 448: 206-211
119. Zhou T, He X, Cheng R, Zhang B, Zhang RR, Chen Y, Takahashi Y, Murray AR, Lee K, Gao G, and Ma JX. (2012) Implication of dysregulation of the canonical wingless-type MMTV integration site(WNT) pathway in diabetic nephropathy. *Diabetologia* 55: 255-266
120. Wodarz A, and Nusse R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology* 14: 59-88
121. He X, Semenov M, Tamai K, and Zeng X. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663-1677
122. DeMali KA, Wennerberg K, and Burridge K. (2003) Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* 15: 572-582
123. Brakebusch C, and Fassler R. (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO journal* 22: 2324-2333
124. Boukhalfa G, Desmouliere A, Rondeau E, Gabbiani G, and Sraer JD. (1996) Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Experimental nephrology* 4: 241-247
125. Mu J, Pang Q, Guo YH, Chen JG, Zeng W, Huang YJ, Zhang J, and Feng B. (2013) Functional implications of microRNA-215 in TGF-beta1-induced phenotypic transition of mesangial cells by targeting CTNNBIP1. *PloS one* 8, e58622
126. Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, Eremina V, Hudson BG, Borza DB, Harris RC, Holzman LB, Phillips CL, Fassler R,

- Quaggin SE, Miner JH, and Zent R. (2008) Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Developmental biology* 316: 288-301
127. Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
128. Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, and Burridge K. (1986) Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* 320: 531-533
129. Burridge K, and Mangeat P. (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308: 744-746
130. Belkin AM, and Koteliansky VE. (1987) Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and alpha-actinin with cytoskeletal proteins. *FEBS letters* 220: 291-294
131. Muguruma M, Matsumura S, and Fukazawa T. (1990) Direct interactions between talin and actin. *Biochemical and biophysical research communications* 171: 1217-1223
132. Otey CA, Pavalko FM, and Burridge K. (1990) An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *The Journal of cell biology* 111: 721-729
133. Hynes RO. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687
134. Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, and Jaenisch R. (1996) Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122: 3537-3547
135. Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA, Beynon AJ, Peters TA, Weening JJ, and Sonnenberg A. (2006) Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *The Journal of cell biology* 175: 33-39
136. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, and Lai YH. (2000) Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life sciences* 67: 2345-2353

137. Regoli M, and Bendayan M. (1997) Alterations in the expression of the alpha 3 beta 1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* 40: 15-22
138. Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B, and Tsilibary EC. (2003) Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 284: F671-679
139. Chen CA, Hwang JC, Guh JY, Chang JM, Lai YH, and Chen HC. (2006) Reduced podocyte expression of alpha3beta1 integrins and podocyte depletion in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis and chronic PAN-treated rats. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 147: 74-82
140. Crider BJ, Risinger GM, Jr., Haaksma CJ, Howard EW, and Tomasek JJ. (2011) Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF-beta1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 131: 2378-2385
141. Gabbiani G. (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of pathology* 200: 500-503
142. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, and Kalluri R. (2006) Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer biology & therapy* 5, 1640-1646
143. Li J, Deane JA, Campanale NV, Bertram JF, and Ricardo SD. (2007) The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. *Stem cells* 25: 697-706
144. Kida Y, and Duffield JS. (2011) Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 38: 467-473
145. Li J, Qu X, and Bertram JF. (2009) Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *The American journal of pathology* 175: 1380-1388
146. Mucsi I, and Rosivall L. (2007) Epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells in the pathogenesis of progressive tubulo-interstitial fibrosis. *Acta physiologica Hungarica* 94: 117-131

147. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, and Neilson EG. (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 110: 341-350
148. Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, and Wright NA. (2001) Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *The Journal of pathology* 195: 229-235
149. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, and Hori M. (2001) Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12: 2625-2635
150. Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van 't Wout K, Martens AC, Goldschmeding R, Joles JA, Van Zonneveld AJ, Grone HJ, Rabelink TJ, and Verhaar MC. (2003) Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *The American journal of pathology* 163: 553-562
151. Lebleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, and Kalluri R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature medicine* 19: 227-231
152. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, and Duffield JS. (2010) Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* 176: 85-97
153. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, and Brown RA. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3: 349-363
154. Hill CS, Wynne J, and Treisman R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81: 1159-1170
155. Mack CP, Thompson MM, Lawrenz-Smith S, and Owens GK. (2000) Smooth muscle alpha-actin CArG elements coordinate formation of a smooth muscle cell-selective, serum response factor-containing activation complex. *Circulation research* 86: 221-232

156. Elberg G, Chen L, Elberg D, Chan MD, Logan CJ, and Turman MA. (2008) MKL1 mediates TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 294: F1116-1128
157. Masszi A, Fan L, Rosivall L, McCulloch CA, Rotstein OD, Mucsi I, and Kapus A. (2004) Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *The American journal of pathology* 165: 1955-1967
158. Fan L, Sebe A, Peterfi Z, Masszi A, Thirone AC, Rotstein OD, Nakano H, McCulloch CA, Szaszi K, Mucsi I, and Kapus A. (2007) Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phosphomyosin pathway. *Molecular biology of the cell* 18: 1083-1097
159. Sebe A, Masszi A, Zulys M, Yeung T, Speight P, Rotstein OD, Nakano H, Mucsi I, Szaszi K, and Kapus A. (2008) Rac, PAK and p38 regulate cell contact-dependent nuclear translocation of myocardin-related transcription factor. *FEBS letters* 582: 291-298
160. Sebe A, Erdei Z, Varga K, Bodor C, Mucsi I, and Rosivall L. (2010) Cdc42 regulates myocardin-related transcription factor nuclear shuttling and alpha-smooth muscle actin promoter activity during renal tubular epithelial-mesenchymal transition. *Nephron. Experimental nephrology* 114: e117-125
161. Sun Q, Chen G, Streb JW, Long X, Yang Y, Stoeckert CJ, Jr., and Miano JM. (2006) Defining the mammalian CArGome. *Genome research* 16: 197-207
162. Kressner C, Nollau P, Grosse R, and Brandt DT. (2013) Functional Interaction of SCAI with the SWI/SNF Complex for Transcription and Tumor Cell Invasion. *PloS one* 8: e69947
163. el Nahas AM, Zoob SN, Evans DJ, and Rees AJ. (1987) Chronic renal failure after nephrotoxic nephritis in rats: contributions to progression. *Kidney Int* 32: 173-180
164. Hirschberg K, Radovits T, Loganathan S, Entz L, Beller CJ, Gross ML, Sandner P, Karck M, and Szabo G. (2009) Selective phosphodiesterase-5 inhibition reduces neointimal hyperplasia in rat carotid arteries after surgical

- endarterectomy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 137: 1508-1514
165. Goldstein I, Young JM, Fischer J, Bangerter K, Segerson T, Taylor T, and Vardenafil Diabetes Study G. (2003) Vardenafil, a new phosphodiesterase type 5 inhibitor, in the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a multicenter double-blind placebo-controlled fixed-dose study. *Diabetes care* 26: 777-783
 166. Zhao HJ, Wang S, Cheng H, Zhang MZ, Takahashi T, Fogo AB, Breyer MD, and Harris RC. (2006) Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17: 2664-2669
 167. Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, and Ziyadeh FN. (2000) Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 278: F628-634
 168. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, and Sharma K. (2000) Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8015-8020
 169. Piecha G, Kokeny G, Nakagawa K, Koleganova N, Geldyyev A, Berger I, Ritz E, Schmitt CP, and Gross ML. (2008) Calcimimetic R-568 or calcitriol: equally beneficial on progression of renal damage in subtotal nephrectomized rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 294: F748-757
 170. Floege J, Alpers CE, Burns MW, Pritzl P, Gordon K, Couser WG, and Johnson RJ. (1992) Glomerular cells, extracellular matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 66: 485-497
 171. Wolf G, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, and Shankland SJ. (2001) High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27(Kip1), an inhibitor

- of cyclin-dependent kinases. *The American journal of pathology* 158: 1091-1100
172. Yevdokimova N, Wahab NA, and Mason RM. (2001) Thrombospondin-1 is the key activator of TGF-beta1 in human mesangial cells exposed to high glucose. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12: 703-712
 173. Jefferson JA, Shankland SJ, and Pichler RH. (2008) Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney international* 74: 22-36
 174. Wolf G, Butzmann U, and Wenzel UO. (2003) The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron. Physiology* 93: P3-13
 175. Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, Zanchi C, Longaretti L, Donadelli R, and Remuzzi G. (2002) Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *The American journal of pathology* 161: 2179-2193
 176. Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, and Chen S. (2002) Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney international* 62: 901-913
 177. Han SH, Yang S, Jung DS, Li JJ, Kim JJ, Kwak SJ, Kim DK, Moon SJ, Lee JE, Han DS, and Kang SW. (2008) Gene expression patterns in glucose-stimulated podocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 370: 514-518
 178. Chen S, Jim B, and Ziyadeh FN. (2003) Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Seminars in nephrology* 23: 532-543
 179. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, Dei Cas A, Thomas SM, Viberti G, and Gnudi L. (2009) Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha3beta1 integrin downregulation. *Nephrology, dialysis, transplantation* 24: 2645-2655
 180. Wu DT, Bitzer M, Ju W, Mundel P, and Bottinger EP. (2005) TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth

- arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 16: 3211-3221
181. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, and Tryggvason K. (2001) The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Human molecular genetics* 10: 1-8
 182. Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler MC, and Antignac C. (2004) Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Molecular and cellular biology* 24: 550-560
 183. Sharma R, Lovell HB, Wiegmann TB, and Savin VJ. (1992) Vasoactive substances induce cytoskeletal changes in cultured rat glomerular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 3: 1131-1138
 184. Wang S, Skorczewski J, Feng X, Mei L, and Murphy-Ullrich JE. (2004) Glucose up-regulates thrombospondin 1 gene transcription and transforming growth factor-beta activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression via upstream stimulatory factor 2. *The Journal of biological chemistry* 279: 34311-34322
 185. Hohenstein B, Daniel C, Wittmann S, and Hugo C. (2008) PDE-5 inhibition impedes TSP-1 expression, TGF-beta activation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation* 23: 3427-3436
 186. Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, and Abdollahi M. (2005) Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* : CBP 140: 251-255
 187. Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, and Shukla N. (2005) Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU international* 96: 423-427
 188. Raji L, and Baylis C. (1995) Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney international* 48: 20-32

189. Pieper GM, Siebeneich W, Moore-Hilton G, and Roza AM. (1997) Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat. *Diabetologia* 40: 910-915
190. Reyes AA, Karl IE, Kissane J, and Klahr S. (1993) L-arginine administration prevents glomerular hyperfiltration and decreases proteinuria in diabetic rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 4: 1039-1045
191. Kamijo H, Higuchi M, and Hora K. (2006) Chronic inhibition of nitric oxide production aggravates diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Nephron. Physiology* 104: p12-22
192. Goldfarb S, and Ziyadeh FN. (2001) TGF-beta: a crucial component of the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 112: 27-32; discussion 33
193. Kolavennu V, Zeng L, Peng H, Wang Y, and Danesh FR. (2008) Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control. *Diabetes* 57: 714-723
194. Tang LX, He RH, Yang G, Tan JJ, Zhou L, Meng XM, Huang XR, and Lan HY. (2012) Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. *PloS one* 7: e31350
195. Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta-Kubara EC, Shortland J, Brown CB, and el Nahas AM. (1997) Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation* 12: 43-50

10 Saját publikációk jegyzéke

- 1 Fang L, Radovits T, Szabó G, Mózes MM, Rosivall L, Kökény G. (2013) Selective phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor vardenafil ameliorates renal damage in type 1 diabetic rats by restoring cyclic 3',5' guanosine monophosphate (cGMP) level in podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 7:1751-61.
- 2 Fintha A, Gasparics Á, Fang L, Erdei Z, Hamar P, Mózes MM, Kökény G, Rosivall L, Sebe A. (2013) Characterization and role of SCAI during renal fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Pathol.* 2:388-400.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Kökény Gábor témavezetőmnek a segítségét és példamutatását a kutatói munka során. Kivételes szerencsének tekintem, hogy témavezetése alatt dolgozhattam. Köszönöm Dr. Mózes Miklósnak a kutatói szemléletmód demonstrálását. Köszönöm Dr. Rosivall László professzor úrnak a mindenkori támogatását. Köszönöm Dr. Sebe Attilának a kutatásért való szenvedélyét és a támogatását, Fazekas Krisztinának és Udri Ágnesnek a labormunka soráni együttműködést. Végül, végtelen hála a Gondviselésnek, hogy Szüleim révén türelmes, biztonságos és motiváló háttérrel kaptam, mely a Férjem és Kisfiam személyében folytatódik az életemben.