

# A vesefibrózis pathomechanizmusainak vizsgálata patkánymodellen – Diabétesz- és toxikus nefropátia

Doktori tézisek

**Dr. Szalay Csaba Imre**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Hamar Péter, D.Sc, egyetemi docens, tanulmányi felelős

Hivatalos bírálók:

Dr. Ambrus Csaba Kálmán, Ph.D, nefrológus szakorvos

Dr. Szász Attila Marcell, Ph.D, egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Ivanics Tamás Ph.D, Dr. habil., egyetemi docens, tanulmányi felelős.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Wagner László Ph.D, egyetemi docens

Dr. Thuma Ákos Ph.D, laboratóriumi állatorvos

Dr. Fekete Andrea Ph.D, egyetemi tanársegéd

Budapest  
2016

# 1. Bevezetés

A krónikus veseelégtelenség (chronic kidney disease, CKD) gyakori, súlyos kórkép, mely vesefibrózishoz és végstádiumú vesebetegséghez (end stage renal disease, ESRD) vezet. Az ESRD egy életet veszélyeztető állapot, amely vesepótló kezelést (pl. hemodialízis, peritoneális dialízis), vagy vese transzplantációt tesz szükségessé. Az ESRD leggyakrabban cukorbetegség talaján alakul ki. A krónikus veseelégtelenség lefolyásának gyorsaságát többek között az alapbetegség, az életkor és a nem befolyásolja, de egyre több tudományos adat erősíti meg a genetikai háttér szerepét a betegség progressziójában. Az elmúlt évtizedekben nagy előrelépések történtek a vesefibrózis kialakulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok megismerése terén, de a fibrózis folyamatát visszafordítani gyógyszeres terápiával még nem vagyunk képesek.

A krónikus veseelégtelenség különböző formái feloszthatóak aszerint, hogy a kezdeti károsító hatás a nefron melyik funkcionális egységét érinteti elsődlegesen. A glomerulus károsodás a CKD számos formájának kialakulásában döntő jelentőségű. Ezen belül is a visceralis epithel sejtek, vagyis podocyták szerepe igen fontos. Ezen specializált sejtek szelektív toxikus károsítása önmagában elégséges volt az emberi fokális szegmentális glomerulosclerosishoz (FSGS) hasonló állapot kialakulásához patkánymodellben.

A felsorolt szempontok miatt a kutatócsoportunk több kísérletsorozatot végzett a CKD, kialakulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok vizsgálatára: 1. Vizsgáltuk a diabétesz mellitusz (DM) kapcsán kialakuló glomeruláris károsodást streptozotocin indukálta glomerulopathia modellen, 2. Vizsgáltuk továbbá genetikai háttér szerepét a doxorubicin indukálta toxikus podocyta-károsító modellen.

## 1.1. Diabétesz nefropátia:

A diabétesz nefropátia (DN) a cukorbetegség egyik, elsősorban a vesét érintő súlyos szövődménye. A cukorbetegnek közel 20-30%-át érinti, és a végállapotú vesebetegség eseteinek közel a feléért felelős. A DN első jele a mikroalbuminuria, amit nefrózis szindróma kifejlődése követ magas vérnyomással és a vesefunkció fokozódó beszűkülésével.

Újabb irodalmi adatok felhívják a figyelmet arra, hogy az inzulin hatás hozzájárul a podocyták megfelelő működéséhez. Az inzulin receptor génjének csendesítése podocytákban albuminuriához és a DN-hoz hasonló szövettani elváltozások

kifejlődéséhez vezetett normális szérum glukóz szint mellett is. Inzulin hozzáadása podocytá sejt kultúrához a sejtek aktin-szerkezetének gyors átrendeződéséhez vezetett. A citoskeleton épségének döntő jelentősége van a glomeruláris barrier-funkció fenntartásában, ezért a citoskeleton szerveződését szabályozó fehérjék alkalmas terápiás célpontok lehetnek a DN kezelésére.

Az ezrin egy fontos szabályzó molekulája az aktin hálózat átépülésének. Az ezrin és az interakciós partnere, az NHERF2 (nátrium-hidrogén kicserélő regulációs kofaktor) az egyes membránfehérjék és az aktin hálózat között létesítenek kapcsolatot. A podocyták egyik sejt felszíni fehérjéje, a podocalyxin az ezrin és az NHERF2 közvetítésével kapcsolódik az aktin citoskeletonhoz. Emellett az ezrin N-terminális vége glikozilált fehérjékkel is kapcsolatot létesít cukorbeteg patkányokban. Az ezrinnek így szerepe lehet DN kifejlődésében.

## **1.2. A genetikai háttér szerepe krónikus veseelégtelenségben**

A krónikus veseelégtelenség lefolyása igen jelentős különbségeket mutathat azonos alapbetegséggel rendelkező páciensek között. Családokon belül ezzel szemben igen hasonló lehet a vesefibrózis kialakulásának üteme. A genetikai háttér szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy egyes rasszoknál a vesebetegség egyes bizonyos gyakrabban fordulnak elő az átlag populációhoz képest.

Genom szintű asszociációs vizsgálatok, valamint családfa analízisek segítségével több olyan gént is sikeresen azonosítottak, amelyeknek az elégtelen működése krónikus veseelégtelenség kialakulását eredményezi. Ilyen gének közé tartozik többek között a nefrózis 1 (NPHS1) gén, amelyik a nephrint kódolja; az  $\alpha$ -actinin 4-et kódoló gén (ACTN4) és a miozin nehéz lánc 9 fehérjét kódoló gén (MYH9). A felsorolt gének mind olyan fehérjéket kódolnak, amelyek fontos szerepet játszanak a podocyták működésében és a résmembrán (slit diaphragm) strukturális és funkcionális integritásának fenntartásában.

## 2. Célkitűzés

A vizsgálataink célja a krónikus veseelégtelenség és a vesefibrózis kialakulásában szerepet játszó molekuláris folyamatok jobb megértése volt.

Először a korai glomeruláris folyamatokat vizsgálatuk streptozotocin indukálta diabétesz nefropátia modellen. Kísérleteinkkel a diabétesz nefropátiás vizsgálatban az az alábbi célokat tűztük ki:

1. Megállapítani, hogy milyen fehérje expressziós változások alakulnak ki a diabétesz nefropátia korai stádiumában.
2. A megváltozott expressziójú glomeruláris fehérjék azonosítása.
3. Az azonosított fehérjék szerepének vizsgálata a diabétesz nefropátia kialakulásában.

A második kísérletsorozat egy, az intézetben végzett korábbi vizsgálat folytatása volt. Rowett csuklyáspatkányok (black hooded, BH) korábban ellenállónak bizonyultak só- és fehérjeterheléssel kombinált szubtotális nefrektómia modellben. A kísérleteink során ennek a rezisztenciának a hátterét szándékoztuk megismerni. A korábbi megfigyeléseink alapján felmerült annak a lehetősége, hogy az oxidatív stresszre adott válasznak szerepe lehet a BH patkányok rezisztenciának kialakulásában. Vizsgálataink során a doxorubicin-nefropátia modellt alkalmaztuk. A toxikus nefropátiás vizsgálatban az alábbi célokat tűztük ki:

1. Megállapítani, hogy a Rowett patkányok ellenállónak mutatkoznak-e a podocyták toxikus károsításával szemben?
2. Megfigyelni, hogy a vese funkcionális és strukturális elváltozásainak milyen különbségei alakulnak ki a Doxorubicin kezelés nyomán.
3. Az oxidatív stressz mértékének és lehetséges szerepének vizsgálata a Rowett patkányokban.

## 3. Módszerek

### 3.1. Kísérleti állatok:

A diabétesz nefropátiás vizsgálat során 230 +/- 10 gramm súlyú, hím Sprague-Dawley (SD) patkányokat, valamint 12 hetes elhízott (fa/fa) és sovány (fa/+) Zucker patkányokat használtunk. A toxikus nefropátiás vizsgálatban pedig 8 hetes Rowett csuklyás patkányokat (black hooded, BH) hasonlítottunk össze a vesefibrózis kialakulására érzékeny, 8 hetes Charles Dawley (CD) patkányokkal.

### 3.2. A diabétesz nefropátiás vizsgálat:

#### 3.2.1. A diabétesz kifejlődése

Hím SD patkányokat (n=5) savanyú (pH: 4.5) citrát pufferben oldott streptozotocinnal (STZ) injektáltunk 60 mg/testsúlykilogramm dózisban intraperitoneálisan. A kontroll csoport tagjai (n=5) csak citrát puffert kaptak. A cukorbetegség kifejlődését az STZ injekció után 1 héttel ellenőriztük az éhgyomri vércukor mérésével, valamint az injekció után 4 hét múlva orális glukóz tolerancia teszttel. A vizelet albuminürítést is 4 héttel az STZ injekció után mértük meg. A 12 hetes elhízott (fa/fa) és sovány Zucker patkányokat az ezrin expresszió megváltozásának igazolására használtuk. Az elhízott Zucker patkányok hyperphagiásak, és 2es típusú diabéteszre jellemző elváltozások alakulnak ki bennük spontán az idő előre haladtával.

#### 3.2.2. A vizelet albumin ürítés kimutatása

24 órás vizeletgyűjtést végeztünk diurézis ketrecben az STZ és citrát injekció előtt, valamint az injekció után 4 héttel. A vizelet albumin szintjét albumin specifikus ELISA kit segítségével mértük meg.

#### 3.2.3. Leölés és a szervek eltávolítása

Az STZ-vel, vagy citráttal injektált patkányokat ketamin+xylazin keverékkel altattuk el. A patkányokat az aorta bifurcatio megszurásával kivérettük, majd a szerveket 60 ml hideg, fiziológias sóoldattal perfundáltuk. Mindkét vesét eltávolítottuk további vizsgálatra. Minden kísérleti állat az egyik veséből glomerulust izoláltuk egy speciális szűrőrendszer segítségével.

### *3.2.4. Kétdimenziós fluoreszcens differenciál gélelektroforézis (2D-DIGE)*

A diabéteszes és kontroll SD patkányok izolált glomerulus frakciójából lízis puffer segítségével fehérjét izoláltunk. A kapott oldatok fehérjekoncentrációját 2D Quant Kit segítségével mértük meg. A cukorbeteg, vagy a kontrollcsoportba tartozó állatok 50-50 µg izolált fehérjemintáját a CyDye DIGE Fluor Minimal Labeling Kit Cy3, vagy Cy5 festékével jelöltük meg. Belső kontrollnak az összes állat mintájának poolozásával készített referencia mintát használtuk, amit Cy2-vel jelöltük. A fehérjék izoelektromos fókuszálását lineáris pH 3-10, 24 cm Immobiline™ DryStrips segítségével, a méret szerinti elválasztást pedig SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. A gélek festékkel jelölt pontjainak intenzitását egy referenciaként kijelölt kontroll gél azonos pontjaihoz hasonlítottuk a DeCyder 2D 7.0 szoftver segítségével. Az intenzitásértékeket a poolozott minta Cy2-vel festett azonos pontjainak intenzitásához hasonlítva normalizáltuk. A normalizált relatív intenzitásértékeket összehasonlítottuk a csoportok között. Szignifikánsan különbözőnek csak a másfélszeres intenzitás különbségnél nagyobb értékeket tekintettük, >95%-os konfidencia intervallummal (Kétmintás t-próba és ANOVA,  $p < 0.05$ ).

### *A fehérjék azonosítása folyadékkromatográfiával*

A vizsgálni kívánt pontokat kivágtuk az előzőekhez hasonlóan előkészített, de ezüsttel jelölt 2D gélekből. A gél darabok tripszines emésztésével kapott peptideket folyadékkromatográfiával vizsgáltuk tovább. A kapott eredményeket összevetettük a SwissProt adatbázissal, hogy azonosítsuk a peptideket. Az így azonosított fehérjék közül az ezrint és az NHERF2-t vizsgáltuk tovább.

### *3.2.5. Immunblottolás*

Három diabéteszes és három kontroll patkány glomerulus izolátumát használtuk a 2D gélelektroforézis eredményeinek szemikvantitatív ellenőrzésére. Vizsgáltuk továbbá az ezrin, NHERF2, podocin és podocalyxin expresszió különbségét 12 hetes elhízott és sovány Zucker patkányok veséinek glomerulus izolátumaiból is.

### *3.2.6. Patkány vesék immunhisztokémiai vizsgálata*

Mélyfagyasztott SD patkány vese metszeteket acetonban fixáltunk. A fixált vesemetszeteket egér anti-ezrin, nyúl anti-p-ezrin (foszforilált ezrin), nyúl anti-NHERF2

és nyúl anti-podocin antitesttel inkubáltuk. A primer antitestek kimutatását AlexaFluor 555 számár anti-nyúl és AlexaFluor 488 számár anti-egér immunglobulinnal végeztük.

### 3.2.7. Humán vesék immunhisztokémiai vizsgálata

Cukorbeteg és nem cukorbeteg páciensektől származó, vesedaganat miatt eltávolított vesék immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. A minták a Helsinki és Uusimaa régióba tartozó kórházakból származtak. A szövettani metszeteken csak a daganatos infiltrációtól megkímélt területeket vizsgáltuk. A páciensek cukorbetegsége vonatkozó adatait a betegdokumentáció alapján értékeltük. A vesemintákat anti-ezrin antitesttel jelöltük és ABC-reagenssel festettük. Mintánként 6 glomerulust vizsgáltuk összesen 13 diabéteszes és 14 kontroll páciensztől. A festődés erősségét két kutató egymástól függetlenül és a csoportok ismerete nélkül határozta meg. Szövettani vizsgálathoz perjódsv-Schiff (PAS) festést használtunk.

## 3.3. A toxikus nefropátia vizsgálat

### 3.3.1. Glomerulus károsítás doxorubicinnel

A vizsgált során az alábbi 2 kísérletet végeztük el:

1. Vesefunkciós és morfológiai eltérések vizsgálata DXR-indukált toxikus podocytá károsodás után.
2. Hosszú távú túlélés vizsgálata azonos mennyiségű DXR injekció után.

A funkcionális és morfológiai kísérletben (1.) 8 hetes BH és CD patkányoknak (n=8) 5 mg/testsúlykilogramm DXR-t adtunk intravénásan, fiziológiás sóoldatban oldva. A törzs azonos negatív kontroll állatok azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kaptak. A BH és CD állatok vizelet fehérje és neutrofil zselatináz-asszociált lipokalin (NGAL) ürítését 8 héten keresztül vizsgáltuk, ennek végén az állatokat leöltük, a szerveiket eltávolítottuk.

A túlélő kísérletben (2.) szintén 8 hetes BH és CD állatokat használtunk. Intravénásan 5 mg/testsúlykilogramm DXR beadása után a kísérleti állatokat szoros megfigyelés alatt tartottuk és az uraemia fizikális jeleinek megjelenése után az egyes állatokat elaltattuk.

Annak eldöntésére, hogy az 1. kísérletben tapasztalt funkcionális és szövettani eltérések pusztán az eltérő mértékű fehérjeürítés következményei lennének, az 1. kísérlet állataiból két alcsoportot (BH/DXRp, CD/DXRp) hoztunk létre. Ebben a vizsgálatban a két, fehérjeürítés szempontjából szignifikáns különbséget nem mutató alcsoportot

hasonlítottuk össze tubuláris, gyulladós és fibrózisa jellemző markerek fehérjék expressziója szempontjából.

### *3.3.2. Vizelet fehérje és NGAL ürítés meghatározása*

A funkcionális és morfológiai kísérletben a DXR-el, vagy fiziológias sóoldattal injektált állatoktól kéthetente 24 órás vizeletgyűjtést végeztünk diurézis ketrecben a 8 hétig. A vizeletminták fehérjetartalmát pyrogallol-alapú kolorimetriás módszerrel, a vizeletminták NGAL tartalmát pedig patkány Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA kittel mértük meg.

### *3.3.3. Leölés és a szervek eltávolítása*

A DXR-el, vagy fiziológias sóoldattal injektált állatokat a kezelés után 8 héttel ketamin+xylazin keverékkel elaltattuk, kivéztettük a szerveiket pedig perfundáltuk a diabétesz nefropátiás kísérlethez hasonlóan. Mindkét vesét és a szívet eltávolítottuk. A szívet és az egyik vese harmadát paraffinba ágyaztuk szövettani és immunhisztokémiai vizsgálathoz. A maradék 2/3-ad vesét pedig folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk további felhasználásig.

### *3.3.4. A vesemorfológia vizsgálata*

A paraffinba ágyazott vesékből készült metszeteket hematoxylin-eozin (HE), perjódsav-Schiff (PAS) és Picro-Sirius vörös festéssel jelöltük.

A glomerulosclerosis mértékét egy módosított score-rendszer segítségével (El Nahas és mtsai. 1987) végeztük PAS festett metszeteken, 400x-os nagyításon. Minden vizsgált vese egy átlagos glomerularis score értéket kapott 100 glomerulus vizsgálata után.

A tubulointerstitialis károsodást szintén PAS festett metszeteken végeztük egy szemikvatitativ score rendszer segítségével. 100x-os nagyítással, a látótér érintettsége alapján, látóterenként 0-4-ig osztályoztuk a tubulointerstitialis sérülés mértékét. Minden vizsgált vese egy átlagos tubulointerstitialis score értéket kapott 15 látótér vizsgálata után.

A gyulladós sejtes infiltráció értékelését HE festett metszeteken, szintén egy szemikvatitativ score rendszer segítségével végeztük. 400x-os nagyítással, a látótér érintettsége alapján, látóterenként 0-4-ig osztályoztuk a gyulladós infiltráció mértékét. Minden vizsgált vese egy átlagos gyulladós score értéket kapott 120 látótér vizsgálata után.



A kollagén depozíciót Picro-Sirius vörös festett metszeteken vizsgáltuk. A fibrotikus területeken a festődés mértékét ImageJ szoftver segítségével számszerűsítettük.

### *3.3.5. Immunblottolás*

A DXR-el, vagy fiziológias sóoldattal injektált BH és CD patkányok kéregdarabjából RIPA pufferrel fehérjét izoláltunk. A kapott oldatok fehérjekoncentrációját 2D Quant Kit segítségével ellenőriztük. A fehérjekoncentrációt bicinchoninsavas módszerrel határoztuk meg. 20-20 µg fehérjét használtunk kísérleti állatonként 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) és nitrotirozin (NT) meghatározásra.

### *3.3.6. Patkány vesék immunhisztokémiai vizsgálata*

Paraffinba ágyazott BH és CD patkányok vesemintáit anti-fibronectin antitesttel jelöltük, színreakciót az avidin-bitoin módszerre végeztünk. Szintén paraffinos vese metszeteken végeztünk HNE és NT immunhisztokémiai vizsgálatot. A színreakciót diaminobenzidine (DAB) kit-tel idéztük elő.

### *3.3.7. A szív fibrotikus elváltozásainak vizsgálata*

DXR-injektált BH és CD patkányokból eltávolított szíveket paraffinba ágyaztunk. Azonos magasságban metszett szív mintákból Masson festéssel értékeltük a kollagén depozíciót. Direkt immunfluoreszcenciával a connexin-43 festődést (Cx43) vizsgáltuk. Utóbbi érzékeny markere a cardiomyocita károsodásnak.

### *3.3.8. Különböző markerek mRNS-szintjének vizsgálata valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével*

Messenger RNS-t 50-80 mg-os vesedarabokból izoláltunk TRI reagens segítségével. 1µg izolált RNS frakcióból reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő random hexamer primerek és High-Capacity cDNA Archive Kit felhasználásával. Az előkészített mintákból NADPH-oxidáz 2 (NOX-2, p91phox, citokróm b-245 béta polipeptid), 1-es típusú neutrofil citoszol faktor (Ncf1, p47phox), 1-es típusú kollagén alegység (COL1A1), transforming growth factor β1 növekedési faktor (TGF-β1), kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) és 1-es típusú makrofág kemotaktikus protein, (MCP-1, chemokine (C-C motif) ligand 2, Ccl2) mRNS-szinteket mértünk kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével. A kapott értékeket aktin mRNS szintre normalizáltuk. A nephrin mRNS

szinteket dupla-szálú DNS alapú RT-qPCR-rel mértük Maxima SYBR Green RT-qPCR Master Mix-szel. A kapott értékeket gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz mRNS szintre normalizáltuk. Az értékeket egy kiválasztott referencia kontroll állat értékeihez viszonyítva ábrázoltuk.

### **3.4. Statisztika**

Kétmintás t-próbát alkalmaztunk az STZ-vel, vagy citráttal injektált SD patkányok mért értékeinek, valamint a BH/DXRp és CD/DXRp alcsoportok mért értékeinek összehasonlítására. Két szempontos variancia analízist használtunk többszörös összehasonlítással, vagy anélkül, a DXR-el, vagy fiziológias sóoldattal injektált BH és CD patkányok mért értékeinek összehasonlítására. A poszt-hoc analízist Holm-Sidak teszttel végeztük. Az adatok logaritmusos transzformációját akkor végeztük el, amikor a Bartlett teszt a varianciák szignifikáns inhomogenitását jelezte. Túlélést a Kaplan-Meier teszttel vizsgáltuk. A különbséget szignifikánsnak értékeltük, ha P érték kisebb volt, mint 0.05.

## 4. Eredmények

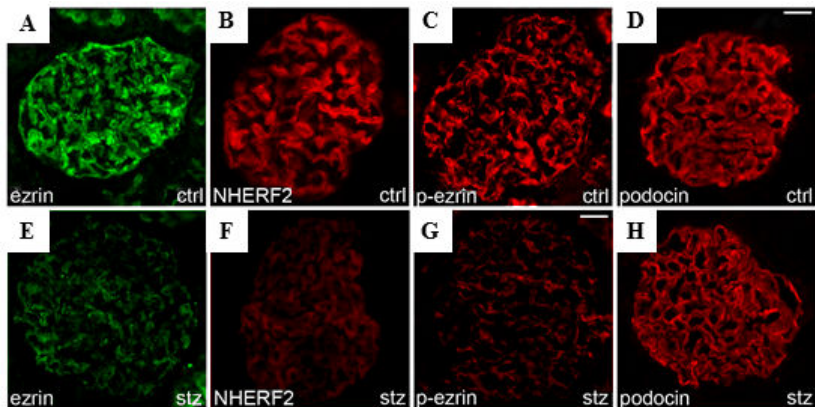
### 4.1. A diabétesz nefropátiás vizsgálat eredményei

#### 4.1.1. *A streptozotocin által indukált diabetes megváltoztatta a glomeruláris fehérjék expresszióját*

Összehasonlítottuk a cukorbeteg és a kontroll SD patkányok glomeruláris fehérje frakcióit kétdimenziós fluoreszcens differenciál gélelektroforézis (2D-DIGE) segítségével. A gélek kiértékeléséhez használt DeCyder szoftver 2274 pontot azonosított, amelyek mindegyik gélen jelen voltak. Ebből a 2274 pontból 29 esetben mértünk szignifikáns különbséget a festődés mértékében a cukorbeteg és a kontroll csoportok között. 15 pontban magasabb (maximum 3.16-szeres növekedés), 14 pontban alacsonyabb (maximum 3.11-szeres csökkenés) értékeket mértünk a kontrollhoz képest. A gélek 29 pontjának folyadékkromatográfiás vizsgálatával 17 pontban többféle-, 12 pontban egyféle peptidet azonosítottunk. A 12 egyedülálló fehérje közé aktin kötő, az aktin citoszkeleton szabályozó, apoptózissal összefüggő, az oxidatív toleranciával összefüggő, DNS kötő és a DNS javításban résztvevő fehérjék tartoztak.

#### 4.1.2. *Az ezrin és az NHERF2 down-regulálódott a cukorbeteg állatok glomerulusaiban*

Az ezrin és az NHERF2 is a folyadékkromatográfiával azonosított 12 egyedülálló fehérje közé tartozott. Az ezrin 2.1-szeres, az NHERF2 1.94-szeres csökkenést mutatott cukorbeteg SD patkányokban. Szemikvantitatív Western blott-tal igazoltuk az ezrin 49%-os, és az NHERF2 42%-os csökkenését az STZ-vel injektált állatokban. Az ezrin foszforillációja az 567-es treoninon szintén 49%-al csökkent. Ez az eredmény arra utal, hogy nem csak a teljes ezrin mennyiség, hanem ezen belül a foszforilált, aktív ezrin mennyisége is csökkent a cukorbeteg patkányok glomerulusaiban. Emellett az ezrin/NHERF2-komplexen keresztül az aktin citoszkeletonhoz kapcsolódó podocalyxin expressziója is 35%-al csökkent. Ezzel szemben a podocyták felszínén található podocin expressziója nem változott. Immunfestéssel csökkent ezrin, foszforilált ezrin (p-ezrin) és NHERF2 expressziót láttunk a cukorbeteg patkányok glomerulusaiban, de a podocin festődésében lényeges eltérés nem volt megfigyelhető. (1. ábra)



**1. ábra: Patkány vese immunhisztokémia: ezrin, NHERF2, foszforilált ezrin, podocin festődés**

A-D: Citrát pufferrel injektált kontroll (ctrl) patkányok glomerulusai,

E-H: Streptozotocinnal injektált (stz), cukorbeteg patkányok glomerulusai.

Lépték = 30  $\mu$ m.

*4.1.3. Az ezrin expresszió csökkent az elhízott Zucker patkányok, valamint a 2-es típusú diabéteszben szenvedő páciensek glomerulusaiban.*

Szemikvantitatív Western blot segítségével az elhízott Zucker patkányok glomerulusaiban is sikerült igazolni az ezrin expresszió csökkenését. A vesedaganat miatt eltávolított humán vesék tumor által nem érintett részleteiben is kisebb mértékű ezrin expresszió volt kimutatható, amennyiben a páciens diabéteszes volt. Az érintett páciensek betegdokumentációjában sem albuminuriára, sem beszűkült vesefunkcióra utaló adat nem szerepelt. A veseminták szövettani vizsgálatával a diabétesz nefropátiára jellemző szövettani eltérések még nem voltak megfigyelhetők.

## **4.2. A toxikus nefropátiás vizsgálat eredményei**

*4.2.1. Nem volt számottevő szívkárosodás 8 héttel a DXR injekció után.*

8 héttel a DXR, vagy fiziológiás sóoldat beadása után sem a BH, sem a CD állatok szívének szövettani vizsgálatával lényeges kollagén depozíció nem volt megfigyelhető. A connexin-43 immunfestéssel a cardiomyocyták finom struktúrájának eltérései sem voltak megfigyelhetők.

#### *4.2.2. A CD állatok halálózása magasabb volt a BH állatokéhoz képest*

A BH patkányok az 5 mg/testsúlykilogramm DXR injekció után később kerültek moribund állapotba a hasonlóan kezelt CD állatokkal összehasonlítva. Az átlagos túlélési idő DXR injekció után a CD patkányok esetében 85 nap, a BH patkányok esetében 108 nap volt ( $p < 0.05$ ).

#### *4.2.3. A DXR injekció CD patkányokban erősebben gátolta a súlygyarapodást*

A DXR injekció után 4 héttel a vesebeteg CD patkányok (CD/DXR) súlygyarapodása szignifikánsan elmaradt a fiziológiás sóoldattal injektált CD patkányokéhoz (CD/c) képest. A DXR-rel injektált BH patkányok (BH/DXR) esetében ez a csökkenés csak a 8 héten ért el szignifikáns értéket a kontroll BH patkányokhoz (BH/c) képest.

#### *4.2.4. A DXR-rel injektált BH állatokban kisebb mértékű proteinuria alakult ki*

Az 5 mg/kg DXR masszív proteinuriát okozott a kezelt CD patkányokban már 2 héttel az injekció után. A DXR-rel injektált BH patkányok esetében proteinuria a 4. hétre fejlődött ki, és minden vizsgált időpontban kisebb mértékű volt a CD/DXR csoportban mérthez képest. A vesetubulusokat bélelő hámsejtek károsodását jelző vizelet NGAL ürítés mindkét DXR-rel injektált csoportban megfigyelhető volt a 4. héttől, de a BH/DXR állatokban minden mérési időpontban kisebb értékeket mértünk a CD/DXR csoporthoz képest.

#### *4.2.5. Nagyobb mértékű veseszövet-károsodás alakult ki CD patkányokban*

A DXR-rel injektált BH és CD állatokban FSGS-szerű szövettani eltérések alakultak ki. Az elváltozások csak a glomerulusok adott hányadát érintették. A BH/DXR csoport tagjainak veséiben nagyobb arányban találtunk ép glomerulusokat. Gyakoribb volt a glomerulus sérülés a CD/DXR csoportban, és nagyobb arányban találtunk enyhén (Score: 0.5–1.5; CD: 50.7% vs. BH: 28.4%), vagy súlyosan sérült (Score  $\geq 2$ , CD: 13.3% vs. BH: 3.3%) glomerulusokat is ezekben az állatokban. A nagyobb mértékű vizelet fehérje- és NGAL ürítéssel egybevágóan a tubulointerstitialis károsodás és a gyulladással infiltráció is súlyosabb volt a DXR-rel injektált CD patkányokban a DXR-rel injektált BH patkányokhoz képest (1. táblázat).

### 1. táblázat: Vese score értékek

CD: Charles Dawley patkányok, BH: Rowett csuklyás patkányok, kontroll: fiziológias sóoldattal injektált patkányok, /DXR: Doxorubicinnel injektált patkányok (dózis: 5 mg/kg). n=8/csoport.

Csoport	Ép glomerulusok (%)	Glomerulosclerosis score érték	Tubulus score érték	Gyulladásos score érték
CD/DXR	36.3 ± 13.4	0.79 ± 0.22	2.01 ± 0.64	1.61 ± 0.32
BH/DXR	68.3 ± 8.4	0.32 ± 0.11	0.86 ± 0.44	1.06 ± 0.20
Kontroll	93.3 ± 4.4	0.06 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.18 ± 0.06
P érték (CD/DXR vs. BH/DXR)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01

4.2.6. A kisebb mértékű szöveti fibrózis mellett az oxidatív károsodás és a gyulladásos markerek szintje is kisebb volt a BH patkányokban

A Sirius vörössel festett vesemintákon kifejezettebb volt a szöveti kollagén depozíció mértéke a DXR-rel injektált CD állatok esetében a DXR-rel injektált BH állatokhoz viszonyítva. Fibronektin immunhisztokémiával csak a metszetek 5.2±0.6%-a festődött a törzs azonos kontrollesoportokban. DXR injekció után 8 héttel jelentős fibronektin festődés volt látható a CD állatok veséiben, ezzel szemben minimális a BH állatok veséiben.

Ezekkel az eredményekkel összhangban a BH/DXR csoport vesemintáiban a TGF-β1 és a CTGF mRNS szintje nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoportokétól, de jelentősen emelkedett a CD/DXR csoportban. A COL1A1 mRNS szintek mindkét DXR-rel kezelt csoportban emelkedtek a kontrollhoz képest, de a növekedés alacsonyabb volt a BH patkányok esetében.

A nephrin mRNS szintje csökkent a DXR-rel injektált CD állatok veséiben, ezzel szemben a BH/DXR csoportban nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól. Ez alátámasztja a szövettani vizsgálattal is megfigyelt enyhébb glomeruláris károsodást ebben a csoportban.

Vizsgáltuk továbbá a gyulladásos markerként használt 1-es típusú monocyta kemotaktikus protein (MCP-1), valamint az oxidatív stressz markerként használt p91phox és p47phox

mRNS szinteket is. Mindkét DXR-rel kezelt csoportban emelkedett ezeknek a szintje, de az emelkedés mértéke a BH/DXR csoportban enyhébbnek mutatkozott.

A nagyfokú proteinuria és strukturális károsodások háttérében intenzív HNE és NT festődést láttunk a DXR-rel injektált CD patkányoknál 8 héttel a kezelés után. A HNE a lipid peroxidáció, a NT pedig a nitratív stressz jellemző markere. A BH/DXR csoportban enyhébb festődés volt megfigyelhető, amit a Western blott eredmények is megerősítettek.

#### 4.2.7. A tubulointerstitialis fibrózis és a gyulladás mértéke enyhébb volt a BH/DXR csoportban azonos mértékű proteinuria mellett is

A DXR-rel kezelt csoportok állataiból elkülönítettünk két alcsoportot (BH/DXRp és CD/DXRp), amelyek nem különböztek szignifikánsan a 24 órás vizelet fehérje ürítés tekintetében. Ebben a két alcsoportban már nem mutatkozott szignifikáns különbség a nephrin mRNS szint és a fibronectin festődés tekintetében. Ezzel szemben az interstitialis kollagén felhalmozódás, a fibrotikus, gyulladásos, és az oxidatív károsodás jelei jelenősen enyhébbek voltak a BH patkányok esetében (2. táblázat).

**2. táblázat: A doxorubicinnel injektált Rowett, és Charles Dawley patkányok összehasonlítása azonos mértékű proteinuria mellett (BH/DXRp és CD/DXRp alcsoportok).**

	<b>CD/DXRp (n = 4)</b>	<b>BH/DXRp (n = 5)</b>	<b>P érték</b>
Vizelet fehérje, 8. hét (mg/24 óra)	396.5 ± 82.2	362.5 ± 30.3	0.42
Nephrin	0.68 ± 0.16	0.87 ± 0.19	0.19
Vizelet NGAL, 8. hét (mg/24 óra)	10.1 ± 2.0	5.2 ± 1.6	<0.01
Sírius vörös festődés (%)	18.0 ± 1.6	11.8 ± 1.0	<0.01
Fibronectin festődés (%)	7.91 ± 2.45	5.55 ± 1.19	0.16
TGF-β1	6.00 ± 2.36	2.13 ± 1.23	<0.05
CTGF	3.71 ± 2.10	0.54 ± 0.11	<0.05
COL1A1	23.09 ± 6.14	5.79 ± 2.41	<0.01
p47phox	4.69 ± 1.51	1.95 ± 0.36	<0.05
p91phox	10.69 ± 2.47	1.94 ± 0.78	<0.01
MCP-1	9.23 ± 3.28	3.46 ± 0.99	<0.05

## 5. Következtetések

A diabétesz nefropátia a cukorbetegség egyik igen súlyos szövödménye. A kialakult szövetkárosodás visszafordítására jelenleg nem rendelkezünk megfelelő terápiás lehetőségekkel. Kétdimenziós fluoreszcens differenciál gélelektroforézis és folyadék kromatográfia segítségével azonosítottunk több olyan fehérjét amelyek expressziója megváltozott cukorbeteg patkányokban. Az ezrin nevű aktin kötő fehérje és az interakciós partnere, az NHERF2 szintje is csökkent az STZ-vel kezelt patkányokban. Nem csak a teljes ezrin mennyiség, hanem ezen belül is a foszforilált, aktív ezrin mennyisége is csökkent a cukorbeteg állatok glomerulusaiban. Az ezrin/NHERF2 komplexhez kapcsolódó podocalyxin szintje is csökkent az STZ-vel injektált állatokban. Csökkent ezrin expressziót találtunk elhízott, cukorbeteg Zucker patkányok veséiben és diabéteszes humán nefrektómiás mintákban is. Összefoglalva, a kapott adatok alapján az ezrin down-regulációnak jelentős szerepe lehet a cukorbetegség veseszövödményének kialakulásában.

A Rowett csuklyáspatkányok (black hooded, BH) ellenállónak bizonyultak a doxorubicin okozta toxikus glomerulus károsító modellben. A DXR injekció hatására a vesefibrózisra érzékeny Charles Dawley patkányoknál igen gyorsan proteinuria alakult ki a nephrin expresszió csökkenésével és FSGS-szerű szövettani eltérésekkel. A DXR-rel injektált BH patkányokban a nephrin mRNS szintje hasonló volt a kontroll állatokéhoz, emellett a proteinuria és a glomeruláris károsodás mértéke is kisebb volt. A nagymértékű proteinuria hozzájárult a tubuláris atrófia és interstitialis fibrózis kialakulásához. A BH/DXR csoportban alacsonyabb vizelet NGAL ürítést, enyhébb tubulointerstitialis gyulladást és kisebb mértékű oxidatív károsodást találtunk a CD patkányokhoz képest. Érdekes módon még azonos mértékű proteinuria mellett is nagyobb mértékű tubuláris károsodás, szöveti fibrózis és oxidatív stressz volt megfigyelhető a DXR-rel injektált CD patkányokban. A BH patkányok túlélése is hosszabb volt a DXR injekciót követően. Eredményeink alátámasztják a fibrotikus és gyulladáshoz vezető faktorok, valamint az oxidatív/nitratív stressz mediátorainak szerepét a vesefibrózis progressiójában és a BH állatok rezisztenciájában.



## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1. A tézissel összefüggő publikációk

Wasik AA, Koskelainen S, Hyvonen ME, Musante L, Lehtonen E, Koskenniemi K, Tienari J, Vaheri A, Kerjaschki D, Szalay C, Revesz C, Varmanen P, Nyman TA, Hamar P, Holthofer H, Lehtonen S (2014) Ezrin is down-regulated in diabetic kidney glomeruli and regulates actin reorganization and glucose uptake via GLUT1 in cultured podocytes. *Am J Pathol* 184: 1727-1739.

IF: 4,591

Szalay CI, Erdelyi K, Kokeny G, Lajtar E, Godo M, Revesz C, Kaucsar T, Kiss N, Sarkozy M, Csont T, Krenacs T, Szenasi G, Pacher P, Hamar P (2015) Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation Drive Progression of Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis in Rats as Revealed by Comparing a Normal and a Fibrosis-Resistant Rat Strain. *PLoS One* 10: e0127090.

IF: 3,234

### 6.2. A tézistől független publikációk

Kaucsar T, Revesz C, Godo M, Krenacs T, Albert M, Szalay CI, Rosivall L, Benyo Z, Batkai S, Thum T, Szenasi G, Hamar P (2013) Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic Acid Ther* 23: 344-354.

IF: 2,888

Kaucsar T, Bodor C, Godo M, Szalay C, Revesz C, Nemeth Z, Mozes M, Szenasi G, Rosivall L, Soti C, Hamar P (2014) LPS-induced delayed preconditioning is mediated by Hsp90 and involves the heat shock response in mouse kidney. *PLoS One* 9: e92004.

IF: 3,234

## 7. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Hamar Péternek**, aki végig támogattott engem a PhD tanulmányaim során.

Köszönettel tartozom továbbá kollégáimnak a Kórélettani Intézetben: **Prof. Dr. Rosivall Lászlónak**, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy lehetőséget adott a PhD tanulmányaim elvégzésére; **Dr. Szénási Gábornak** a hasznos tanácsaiért és a szakmai iránymutatásáért, **Godó Máriának**, **Dr. Kaucsár Tamásnak**, **Révész Csabának**, **Cser Ágnesnek**, **Dr. Buday Annának**, **Dr. Kökény Gábornak**, **Dr. Bukosza É. Nórának** és **Dr. Kiss Norbertnek** az alkalmazott módszerek megtanításáért és a kísérletekben nyújtott minden segítségükért. Köszönetet mondok **Dr. Mózes Miklósnak**, hogy aprólékos és építő jellegű kritikáival támogatta a munkámat.

Köszönettel tartozom **Sanna Lehtonen-nek**, **Anita A. Wasik-nak** és **Niina Rouho-nak** és a Helsinki Egyetem, Haartman Intézet munkatársainak azért, hogy lehetőségem volt részt venni a náluk folyó magas szintű kísérleti munkában.

Szeretnék kiemelten köszönetet mondani **Dr. Pacher Pálnak** és **Erdélyi Katalinnak**, valamint a National Institute of Health kardiovaszkuláris élettannal és szöveti sérüléssel foglalkozó munkacsoportjának a kísérleteink pénzügyi és szakmai támogatásáért.

Külön köszönet **Dr. Krenács Tibornak** és **Dr. Meggyesházi Nórának**, az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Sárközy Mártának** és **Dr. Csont Tamásnak** a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai Intézetéből a PhD munkában nyújtott minden segítségért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Glávits Róbertnek**, hogy bevezetett engem a kórszövettan izgalmas világába.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak, hogy végig bátorítottak és támogattak a PhD képzés alatt.

Az értekezés kutatásainak finanszírozását az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) 110810 és 114619-as számú pályázatait, valamint a National Institute of Health és a National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism kutatási programjai biztosították.