

# Liofilizálás: új mintaelőkészítési módszer a szöveti fibrózis kvantitatív analízisének fejlesztésére

Doktori tézisek

**Lakat Tamás**

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Hosszú Ádám, PhD  
Hivatalos Bírálók: Dr. Kökény Gábor, PhD  
Dr. Dolgos Szilveszter, PhD  
Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Reusz György, MTA doktora  
Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Varga Gábor, MTA doktora  
Dr. Folyovich András, PhD

Budapest  
2023

# 1. Bevezetés

A krónikus vesekárosodás (CKD) több mint 800 millió embert érint világszerte, a mortalitást pedig jelentős mértékben növeli. Az erősen progrediáló kórkép folyamatosan csökkenő vesefunkcióval jellemezhető, amely idővel végstádiumú vesekárosodáshoz vezet. A vese igen érzékeny a magas vérnyomás és vércukorszint okozta mikrovaszkuláris károsodásra, ezért a CKD vezető rizikófaktorának a cukorbetegség (DM) tekinthető.

A DM indukálta hiperglikémia számos hemodinamikai, metabolikus, illetve molekuláris mechanizmust aktivál, amelyek következtében a vesében megnő a pro-fibrotikus faktorok expressziója, ez pedig végezetül glomeruloszklerózist, valamint tubulointersticiális fibrózist eredményez. A diabéteszes vesekárosodás (DKD) azonosítása elsősorban proteinúria, illetve csökkent glomeruláris filtrációs ráta alapján történik, azonban a nefropátia számos esetben ezektől függetlenül manifesztálódik. Habár a betegség diagnosztikájában jelenleg a vesebiopszia tekinthető „gold-standard” eljárásnak, a mintavételt kizárólag erősen indokolt esetben hajtják végre. Ezáltal a mai napig fennálló problémának tekinthető a szenzitív, non-invazív biomarkerek hiánya, amelyek alkalmasak lennének a DKD progressziójának monitorozására.

Az utóbbi évtizedben fedezték fel a kollagén bomlástermékeinek jelentőségét, amelyek potenciális markerként szolgálhatnak különböző eredetű szöveti fibrózis diagnosztikájában. A mátrix metalloproteináz-9 által degradált 3-as (C3M), illetve 4-es (tumstatin; TUM) típusú kollagén bomlástermékek, valamint a 3-as típusú pro-kollagén terminális fragmentumának emelkedett szintjét számos *in vivo* állatmodellben összefüggésbe hozták a szöveti hegesedés megjelenésével és terjedésével. Ezen úgynevezett neo-epitópok akár szérumban és vizeletben is detektálhatók, amely tovább növeli diagnosztikai értéküket.

Habár a DKD patomechanizmusa igen összetett folyamat, a betegség megelőzésének és kezelésének elsődleges célja a vércukorszint, illetve a vérnyomás szabályozása. Az intraglomeruláris nyomás angiotenzin-konvertáló enzim gátlókkal, vagy angiotenzin receptor blokkolókkal történő csökkentése a mai napig a DM kezelés alapját képezi. Nagy elemszámú klinikai vizsgálatok során kimutatták, hogy a kezelés

megelőzheti, vagy késleltetheti a mikroalbuminúria kialakulását, valamint lassítja a CKD előrehaladását. További kutatási eredmények alapján feltételezhető, hogy a RAAS gátlók a vérnyomás csökkentésén túl renoprotektív hatásukat egyéb mechanizmusok által is kifejtik.

A liofilizálást a 20. század közepe óta széleskörben alkalmazza a gyógyszeripar, majd idővel utat tört az élelmiszeriparban, valamint a biotechnológiai területeken is. A módszer fő előnye, hogy az enzimek működéséhez elengedhetetlen nedvességtartalom eltávolítását követően a termék akár szobahőmérsékleten is hosszútávon tárolható, ezáltal a szállítás is nagymértékben leegyszerűsödik. Manapság számos területen alkalmazzák a tudományos szférában is, pontos liofilizálási protokollok elérhetősége a szakirodalomban azonban korlátozott.

A módszer hajtóereje a szublimáció, amelynek előnye, hogy a szárítás során a termék mindvégig szilárd halmazállapotú marad. Elsődleges célunk a művelet során a megfelelő mértékű száradás elérése a lehető legrövidebb idő alatt, miközben elkerülendő a liofilizálandó termék szerkezetének sérülése. A kritikus folyamat paraméterek, illetve a szárítás végpontjának meghatározására számos klasszikus- és termoanalitikai módszer elérhető, amelyek az esetek többségében költséges műszereket és magas szakértelmet igényelnek.

A biológiai minták tárolása alapvetően ultrahűtőkben ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), fagyasztva történik, azonban a laboratóriumok tárolási kapacitása az esetek többségében erősen limitált. A fagyasztott minták szállítása továbbá helyigényes, nem biztonságos, és igen költséges. Több tanulmány is bizonyítja, hogy a liofilizált biológiai minták akár szobahőmérsékleten is tárolhatók a termék fehérje- és RNS tartalmának lebomlása nélkül.

A technológiai fejlődés során fény derült arra, hogy a módszer számos kiaknázatlan lehetőséget rejt, és erős potenciállal bír akár a klinikai felhasználás során is.

## **2. Célkitűzés**

1. A renális fibrózis vizeletben ürülő, új típusú biomarkereinek tesztelése DKD patkány modellben.
2. A RAAS gátlók antifibrotikus hatásának vizsgálata DKD patkány modellben.
3. Liofilizálási protokollok beállítása patkány vesére, illetve egyéb biológiai mintákra (patkány szív, tüdő; humán széklet, peritoneális dialízis folyadék).
4. A liofilizálás hatásának vizsgálata a fehérje- és RNS tartalomra hosszútávú tárolás során.
5. A liofilizálás alkalmazhatóságának vizsgálata humán peritoneális dialízis folyadék és széklet minta feldolgozására.

### 3. Módszerek

#### *In vivo kísérletek*

##### DM patkány modell:

Kísérleteinkhez 6 hetes hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat állandó hőmérsékleten tartottuk 12 órás sötétség/fény ciklusok mellett. Az állatok számára a kísérlet során általános laboratóriumi táp, illetve csapvíz *ad libitum* elérhető volt. A diabéteszt sztreptozotocin (65mg/ttkg; 0,1M citrát puffer (pH 4,5)) egyszeri *ip.* injektálásával indukáltuk, majd 72 óra elteltével három véletlenszerű mérés alapján ellenőriztük a patkányok vércukorszintjét. Amennyiben a vércukorszint meghaladta a 15 mmol/l-t az állatokat cukorbetegnek tekintettük. Öt héttel az indukciót követően az állatokat az alábbi randomizált kísérleti csoportokba soroltuk (n=7-8/csoport), majd naponta egyszer *per os* kezeltük 2 héten keresztül: (i) izotóniás sóoldat, mint vivőanyag (D); (ii) Ramipril 10 µg/ttkg (D+Ramipril); Lozartán 20mg/ttkg (D+Losartan); Spironolakton 50 mg/ttkg (D+Spironolactone); Eplerenon 50 mg/ttkg (D+Eplerenone). Kontroll gyanánt azonos korú egészséges állatok szolgáltak (n=8/csoport). A kezelést követően az állatokat termináltuk, majd szérum, vizelet illetve vese mintát gyűjtöttünk. A renális paraméterek (kreatinin, karbamid) meghatározása Hitachi 912 (Roche Hitachi, Bázél, Svájc) készülékkel történt.

##### Renális iszkémia-reperfúziós (IR) károsodás patkány modell:

Kísérleteinkhez 8 hetes hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat állandó hőmérsékleten tartottuk 12 órás sötétség/fény ciklusok mellett. Az állatok számára a kísérlet során általános laboratóriumi táp, illetve csapvíz *ad libitum* elérhető volt.

Altatást követően a hasfalat felnyitottuk, majd a bal vese artériát, illetve vénát atraumatikus klip segítségével elzártuk. A jobb vesét a reperfúziót megelőzően eltávolítottuk. Ötven perc elteltével a klipet eltávolítottuk, majd 5 percen keresztül figyelemmel követtük a reperfúziót. Huszonnégyszer órával a reperfúziót követően az

állatokat termináltuk, majd vese mintát gyűjtöttünk, amelyet fagyasztottunk, vagy 4%-os formalinba helyeztünk a további feldolgozásig.

### *Humán mintavétel*

A human peritoneális dialízis (PD) folyadékot az SE-Gyermekklinikán peritoneális dialízissel kezelt gyermekektől gyűjtöttük. A dialízist 1,5% glükóz tartalmú PD folyadékkal végezték. A mintavétel az első éjszakai otthoni dialízis utáni reggelen történt. A PD folyadék mintákat azonnal fagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

A széklet mintákat egészséges, valamint a SE-Gyermekklinikán gyulladásoos bélbetegséggel kezelt gyermekektől gyűjtöttük. A mintákat 4°C-on tároltuk 24 órán keresztül, majd az alikvotolást követően -80°C-on tároltuk a további felhasználásig.

### *A kollagén formáció biomarkereinek mérése*

A mátrix metalloproteináz 9 (MMP9) által degradált 3-as típusú kollagén, a 3-as típusú rácsáló pro-kollagén N-terminális fragmentuma (rPRO-C3), valamint a tumstatin (TUM) mennyiségi meghatározása vizeletből történt a Nordic Bioscience (Herlev, Dánia) által fejlesztett enzim-kötött immunoszorbens esszé (ELISA) kit segítségével. A proteinek szintjét a vizelet kreatinin szintre normalizáltuk. A méréseket a Nordic Bioscience laboratóriumában végezték.

### *A metabolom analízishez történő feltárás*

A humán széklet minták metabolom analíziséhez történő mintaelőkészítést az MxP® Quant 500 kit (Bioctares, Innsbruck, Ausztria) segítségével végeztük.

### *Liofilizálás és termékfeldolgozás*

A liofilizálást és a protokollok beállítását ScanVac Coolsafe Touch Superior (LaboGene A/S, Allerød, Dánia) készülékkel végeztük. A mintavétel során a patkány

szövetet feldaraboltuk (~20 mm<sup>3</sup>), majd 2 ml-es reakciócsőbe helyeztük oly módon, hogy a száradási felület a lehető legnagyobb legyen. Ezután a fagyasztott mintákat a liofilizálásig -80°-on tároltuk. A liofilizálás során a reakciócsövek mindvégig nyitva voltak. A termék hőmérsékletét a minta magjában elhelyezett Pt 100 termopár szenzor segítségével monitoroztuk. A kiszárított termék aprítását tű (20 Gauge) segítségével, manuálisan végeztük, majd 5 mm-es acélgolyók hozzáadásával, TissueLyser LT (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) műszerrel porítottuk. A száradási felület optimalizálása érdekében a PD folyadékot 50 ml-es reakciócső falára fagyasztottuk folyékony nitrogénben. A porított termékeket 4°C-on tároltuk. A maradék nedvességtartalmat Karl Fischer titrálással határoztuk meg.

#### *Reverz transzkripció kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)*

Total RNA isolation Mini Kit (Geneaid Biotech, New Taipei City, Taiwan) segítségével patkány veséből és szívből teljes RNS-t izoláltunk, majd Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alkalmazásával komplementer DNS-t szintetizáltunk. A *Gapdh*, *Havcr1*, *Lcn2*, *Acta2* és *Rn18s* gének relatív expresszióját SYBR Green I Master enzim mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) hozzáadásával, RT-qPCR módszerrel mértük. Az eredmények analízise LightCycler 96 v.1.1.0.1320 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) szoftverrel történt.

#### *Western blot analízis*

Fagyasztott, vagy liofilizált mintákból proteolízis puffer segítségével teljes fehérjét izoláltunk. A denaturált fehérjét 4-20% gradient Mini-PROTEAN TGX SDS-poliakrilamid gélen (Bio-Rad Hungary, Budapest, Hungary) elektroforézis által szétválasztottuk, majd nitrocellulóz membránon rögzítettük. Blokkolást követően a membránokat specifikus antitest oldatokban ( $\alpha$ SMA, Akt, pAkt, eNOS, peNOS, CTGF) inkubáltuk egy éjszakán át. Mosást követően a membránokat torna-peroxidázhoz kötött másodlagos antitest oldatokban inkubáltuk 1 órán keresztül. A membránokat ismét

mostuk, majd a vizsgált fehérjéket Luminata Forte (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) szubsztrát hozzáadásával, Molecular Imager VersaDoc MP 4000 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével detektáltuk. A denzitometriás analízist Quantity One Analysis 4.6.6 szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végeztük.

### *Szövettan*

Formalinban fixált, majd paraffinba ágyazott patkány vese mintából 3 µm vastag szeleteket metszettünk, majd tárgylemezen rögzítettük. A metszeteket perjódsav-Schiff, Masson trikrom, vagy Picrosirius reagenssel festettük. A digitalizálást követően az analízist Panoramic Viewer v.1.15.2 (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) segítségével végeztük.

### *Terminális dezoxinukleotidil-transzferáz dUTP nick vég jelölés (TUNEL) esszé*

Formalinban fixált, majd paraffinba ágyazott patkány vese mintából 5 µm vastag szeleteket metszettünk, majd Superfrost tárgylemezen (Thermo Shandon, Runcorn, UK) rögzítettük. Az apoptotikus sejtek jelölése TUNEL esszé módszerrel, Apoptag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, USA) segítségével történt. A digitalizálást követően az analízist CaseViewer 2.4 (3DHISTECH Ltd.) szoftverrel végeztük.

### *Immunhisztokémia*

Formalinban fixált, majd paraffinba ágyazott patkány vese mintából 5 µm vastag szeleteket metszettünk, majd tárgylemezen rögzítettük. Az epitóp helyreállítását követően a mintákat mostuk, majd 1 órán keresztül anti-CD45 antitest oldatban (Cat. Nr. ab10558, Abcam plc., 1:500) inkubáltuk. Ismételt mosást követően a metszeteket HISTOLS-R anti-rabbit tormaperoxidáz jelölt detektáló rendszerben (Cat. Nr. 30011.R500, Histopathology, Ltd.) inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A reakciót HISTOLS Resistant AEC Chromogen/substrate System (Cat. Nr. 30015.K,



Histopathology, Ltd.) által katalizáltak. A hematoxylin eosin keresztjelölést követően a kékités csapvízzel történt. A digitalizálást követően az analízist CaseViewer 2.4 (3DHISTECH Ltd.) szoftverrel végeztük.

### *Immunfluoreszcens jelölés*

A fagyasztott patkány veséket Shandon cryomatrix-ba (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ágyasztuk, majd 10 µm vastag szeleteket metszettünk. A tárgylemezre fixált metszeteket 2 órán keresztül anti-αSMA (Sigma-Aldrich, Cat. No. A2547, RRID:AB\_476701; 1:1000) antitest oldatban inkubáltuk. Mosást követően a mintákat 1 órán keresztül anti-mouse IgG Alexa fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A-11001, RRID:AB\_2534069; dilution=1:100) másodlagos antitest oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten. A sejtmagok jelölése Hoechst 33342 (Cell Signaling Technology, Cat. No. 4082S, RRID:AB\_10626776; 1:1000) hozzáadásával történt. A mintákat Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Cat. No. H-1000, RRID:AB\_2336789) segítségével fixáltuk. Az analízist Zeiss LSM 510 Meta (LSM Image Examiner, RRID:SCR\_014344) konfokális lézer mikroszkóppal végeztük.

### *Statisztikai analízis*

A statisztikai analízist GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftver segítségével végeztük. A mintaeloszlást Komogorov-Smirnov normalitás teszt alapján határoztuk meg. Normál eloszlású mintasereg esetén a RAAS gátlók hatását egyutas ANOVA alapján, Bonferroni korrekcióval vizsgáltuk, nem-normál mintaeloszlás esetén pedig Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A liofilizált és fagyasztott minták eltarthatóságának összehasonlítását a mintaeloszlástól függően párosított t-teszt, vagy Wilcoxon teszt segítségével végeztük. A variancia különbségét Levene-teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) szoftverben. A *P* értékeket <0,05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### *A kollagén formáció vizeletben ürülő markerei jelzik a vese fibrózis kialakulását*

Eredményeink alapján renális hipertrófiát, valamint csökkent vesefunkciót tapasztaltunk az STZ indukció hatására, amely alapján a DKD kialakulására következtethetünk. A renális hipertrófiát, valamint a megnövekedett szérumban lévő karbamid szintet a RAAS gátló kezelés egyöntetűen mérsékelte. Habár a RAAS gátlók nem csökkentették a szérumban lévő kreatinin szintet, a Ramipril, Spironolakton és Eplerenon kezelés helyreállította a süllyedt kreatinin clearance értékeket.

A DM hatására megnövekedett az rPRO-C3, uC3M és a TUM szintje vizeletben, amely a 3-as és 4-es típusú kollagén érését, illetve degradációját jelzik. Az uC3M szintjét az Eplerenon kezelés csökkentette.

### *A RAAS gátlók csökkentik a diabétesz indukálta tubulointersticiális fibrózis mértékét*

A renális fibrózis mértékét Masson, valamint Pircrosirius festett szöveti metszeteken értékeltük. A diabétesz hatására kollagén, valamint egyéb extracelluláris mátrix komponensek felhalmozódását figyeltük meg a vesében, amelyet a RAAS gátló kezelés szignifikánsan csökkentett. Eredményeinket alátámasztotta az immunfluoreszcens alfa-simaizom aktin ( $\alpha$ SMA) jelölés is, amely alapján diabétesz hatására az aktin filamentumok feldúsulását azonosítottuk a tubulointersticiális régióban. Továbbá a Western blot analysis során megnövekedett  $\alpha$ SMA fehérje szintet detektáltuk a diabéteszes állatok veséjében, amelyet a RAAS gátló kezelés kontroll szintre csökkentett.

### *Liofilizálási protokoll beállítása patkány vesére*

A fibrózis, valamint egyéb fokális szöveti károsodás precíz értékelése a sérülés inhomogén természetéből adódóan sok esetben kihívást jelent. Korábbi kísérleteink során megfigyeltük, hogy a szövettani analízis, illetve a molekuláris biológiai vizsgálatok gyakorta vezetnek erősen szóró eredményekhez a szöveti károsodás és a

fibrozis értékelése során. Feltételezésünk szerint a liofilizálást követő porítás megfelelően homogén mintát eredményez, ezáltal növeli a molekuláris biológiai mérések precizitását.

Próba-hiba módszer alapján sikeresen beállítottunk egy megfelelő liofilizációs protokollt patkány vese szövetre. A szárítási folyamat során a termék hőmérsékletváltozását a termék magjában elhelyezett Pt 100 termopár segítségével monitoroztuk. A liofilizálást követően a terméken nedves foltok nem voltak megfigyelhetők, a minta poríthatósága megfelelő volt. A klasszikus Karl Fischer titrálás alapján a vesék átlagos víztartalma  $1,5 \pm 0,20$  m/m% (n=5) volt.

*A liofilizálva porítás növeli az RNS és fehérje tartalom mennyiségi meghatározásának precizitását*

Hipotézisünk alátámasztása érdekében, miszerint a liofilizálva porítás növeli a reprodukálhatóságot, elsőként összehasonlítottuk az  $\alpha$ SMA fehérje szintjét fagyasztva, illetve liofilizálva történő izolálást követően. A vizsgálat során azonosítottunk egy kiugró értéket a fagyasztva előkészített csoportban a fehérje inhomogén eloszlását sejtetve.

Az eredmény megerősítése érdekében az alábbi kísérletet végeztük el. Egy diabéteszes patkány vesét félbe vágtunk, majd az egyik felét négy részre osztottuk, amelyek darabokból hagyományos módon, fagyasztva történt a fehérje, illetve RNS izolálás. A vese másik felét liofilizáltuk, porítottuk, majd az izolálást négy ismétléssel végeztük el a homogén elegyből. Ezt követően a két csoportban Levene-teszt segítségével összehasonlítottuk az *Acta2* mRNS, valamint az  $\alpha$ SMA fehérje szórását. A vizsgálat alapján szignifikánsan kisebb szórást tapasztaltunk a liofilizált minták esetében, amely alátámasztja hipotézisünket.

### *A liofilizálás megőrzi az RNS-ek és fehérjék stabilitását hosszútávú tárolás során*

A patkány vesén alkalmazott liofilizálási protokollunkat leteszteltük patkány szíven illetve tüdön is. A maradék átlagos nedvességtartalom a szív esetén  $0,47 \pm 0,13$  m/m% (n=5), míg a tüdő esetén  $3,02 \pm 1,37$  m/m% (n=5) volt.

A hosszútávú eltarthatóság vizsgálata érdekében patkány veséket illetve szíveket félbevágtunk, a szervek egyik felét fagyasztva tároltuk  $-80^{\circ}\text{C}$ -on 20 hónapig, a másik felét pedig liofilizálva tároltuk  $4^{\circ}\text{C}$ -on azonos ideig. Ezt követően párosított t-tesztel összehasonlítottuk az *Acta2*, illetve a *Gapdh* mRNS, valamint az  $\alpha\text{SMA}$  fehérje szintjét a két csoportban, amely alapján nem tapasztaltunk különbséget. Továbbá vizsgáltuk, a Protein kináz B (Akt), illetve az endotél nitrogén-oxid szintáz (eNOS) fehérjék foszforilációs arányát. A vizsgálat alapján a liofilizálás jobban megőrzi a poszt-transzlációs módosulásokat, mint a fagyasztva történő tárolás.

### *A módosított protokoll alkalmas nem-szöveti eredetű biológiai minták liofilizálására*

Az elsődleges szárítás módosításával létrehoztunk egy humán PD folyadék liofilizálására alkalmas protokollt. A liofilizálást követő rehidratálással a PD folyadékot 20x-os koncentrációra töményítettük, amely lehetővé tette a kötőszöveti eredetű növekedési faktor (CTGF) fehérje Western blot módszerrel történő detektálását, amely a hagyományos mintaelőkészítés által nem volt lehetséges.

Továbbá a liofilizálást optimalizáltuk humán széklet minták metabolom analízishez történő mintaelőkészítésre. A szárítást követően a módszert összehasonlítottuk a kereskedelmi forgalomban elérhető MxP® Quant 500 KIT-tel történő mintaelőkészítéssel. Az eredmények alapján mind a detektálható összetevők száma, mind relatív mennyisége magasabb volt a liofilizálással történő mintaelőkészítés során.

## 5. Következtetések

1. A kollagén formáció vizeletben ürülő új típusú biomarkerei képesek kimutatni a diabétesz indukálta renális fibrózist.
2. A fokális szöveti károsodás kvantitatív értékelése gyakorta eredményez erősen szóró adatokat a szuboptimális mintavételből adódóan.
3. A fibrotikus szövetek liofilizálva porítása növeli a molekuláris biológiai mérések (pl. RT-qPCR, Western Blot) precizitását.
4. A liofilizált minták akár 4°C-on történő hosszútávú tárolás során is megőrzik fehérje és RNS tartalmukat, valamint a poszt-transzlációs módosulásokat.
5. A liofilizálás alkalmas a folyékony halmazállapotú biológiai minták (pl. PD folyadék) koncentrálására és prezervációjára.
6. A liofilizálással történő mintaelőkészítést követően a széklet mintákban detektálható komponensek száma és mennyisége magasabb, mint a hagyományos metabolom analízis kittel történő mintaelőkészítést követően.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A doktori értekezéshez kapcsolódó publikációk

Agnes Molnar\*, **Tamas Lakat\***, Adam Hosszu, Beata Szebeni, Anna Balogh, Laszlo Orfi, Attila J. Szabo, Andrea Fekete, Judit Hodrea; Lyophilization and homogenization of biological samples improves reproducibility and reduces standard deviation in molecular biology techniques. *Amino Acids* 53, 917-928 2021 **IF=3.789**

Sandor Koszegi, Agnes Molnar, Lilla Lenart, Judit Hodrea, Dora Bianka Balogh, **Tamas Lakat**, Edgar Szkibinszkij, Adam Hosszu, Nadja Sparding, Federica Genovese, Laszlo Wagner, Adam Vannay, Attila J Szabo, Andrea Fekete; RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition. *J Physiol* 00.0 pp 1-17 2018 **IF=4.547**

### Egyéb publikációk

Dora Bianka Balogh, Agnes Molnar, Adam Hosszu, **Tamas Lakat**, Judit Hodrea, Attila J. Szabo, Lilla Lenart, Andrea Fekete; Antidepressant effect in diabetes-associated depression: A novel potential of RAAS inhibition. *Psychoneuroendocrinology* 118:1047005 2020 **IF=4.905**

Lénárt Lilla, **Lakat Tamás**, Hodrea Judit, Fekete Andrea; A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer szerepe a diabéteshez társuló depresszióban. *Diabetologia Hungarica* 27 : 3pp. 181-187. 7p 2019