

A RENIN-ANGIOTENZIN-ALDOSZTERON RENDSZER GÁTLÁSÁNAK SZEREPE A DIABÉTESZES VESEKÁROSODÁSBAN: KÖZPONTBAN A RENÁLIS FIBRÓZIS

Doktori értekezés

Kőszegi Sándor Balázs

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fekete Andrea, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Fintha Attila, klinikai szakorvos

Dr. Molnár Gergő Attila, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Hosszúfalusi Nóra, egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Nemcsik János, belgyógyász szakorvos

Dr. Cseprekál Orsolya, tanársegéd

Budapest

2021

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....	7
1. BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR.....	9
1.1. Diabétesz mellitusz (DM).....	9
1.1.1. DM diagnóza.....	10
1.1.2. DM szövödményei.....	12
1.2. Diabéteszes vesebetegség (DKD).....	13
1.3. DKD szövettana.....	16
1.4. DKD patomechanizmusa.....	17
1.5. Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer.....	18
1.6. DKD kezelése.....	20
1.7. DKD és a vesefibrózis.....	21
1.8. Vesefibrózis marker molekulái.....	22
1.8.1. Transzformáló növekedési faktor β (TGF- β).....	23
1.8.2. Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF).....	25
1.8.3. Kötőszöveti növekedési faktor (CTGF).....	27
2. CÉLKITŰZÉSEK	29
3. MÓDSZEREK	30
3.1. Kísérleti állatok és kezelésük.....	30
3.2. Laboratóriumi paraméterek.....	32
3.3. Vérnyomás mérés.....	32

3.4.	A vese hisztológiai analízise.....	32
3.4.1.	Perjódsvav-Schiff (PAS) festés	33
3.4.2.	Masson-féle Trichome festés.....	33
3.4.3.	Fibronektin immunhisztokémiai jelölés	34
3.4.4.	Sirius-red festés	34
3.4.5.	A vese immunfluoreszcens vizsgálata.....	35
3.5.	<i>In vitro</i> kísérletek	35
3.6.	RNS-izolálás, cDNS szintézis, RT-PCR reakció.....	36
3.7.	Áramlási citometriás mérés.....	38
3.8.	Fehérje izolálás, western-blot	39
3.9.	Statisztikai kiértékelés	41
4.	EREDMÉNYEK	42
4.1.	<i>In vivo</i> eredmények	42
4.1.1.	DKD kialakulása T1DM állatmodellben.....	42
4.1.1.1.	RAAS-gátlók non depresszor hatásának igazolása.....	42
4.1.1.2.	RAAS-gátlók hatása a metabolikus paraméterekre T1DM állatmodellben	42
4.1.1.3.	RAAS-gátlók javították a veseműködést T1DM állatmodellben	43
4.1.2.	A RAAS-gátlók mérsékeltek a DKD-ra jellemző strukturális és fibrotikus elváltozásokat T1DM állatmodellben	44
4.1.3.	A RAAS-gátlók csökkentették az α -simaizom aktin (α -SMA) mennyiségét az T1DM állatmodellben	50
4.1.4.	A RAAS-gátlók mérsékeltek a fibrózis indukálta növekedési faktorok mennyiségét T1DM állatmodellben.....	52
4.1.5.	A RAAS-gátlók mérsékeltek a mátrix metalloproteináz 2 és szöveti inhibitorának (TIMP1) mennyiségét az T1DM állatmodellben	53
4.2.	<i>In vitro</i> eredmények	54

4.2.1. Magas glükóz hatására a proximális tubulus sejtekben megemelkedett a PDGF fehérje mennyisége	54
4.2.2. A RAAS-gátlók csökkentették a PDGF fehérje mennyiségét a proximális tubulussejtekben.....	55
5. MEGBESZÉLÉS.....	56
6. KÖVETKEZTETÉSEK	63
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	64
8. SUMMARY	65
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	66
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK BIBLIOGRÁFIAI ADATAI.....	80
11. KÖSZÖNÖTNYILVÁNÍTÁS	82

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- α -SMA: α -simaizom aktin (alpha-smooth muscle actin)
- ACE: Angiotenzin II-konvertáló enzim (angiotensin converting enzyme)
- ANGI: Angiotenzin I (angiotensin I)
- ANGII: Angiotenzin II (angiotensin II)
- AGEk: Előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-products)
- ARB: Angiotenzin II receptor blokkoló (angiotensin II receptor blocker)
- AT1R: 1-es típusú angiotenzin receptor (angiotensin II receptor type 1)
- AT2R: 2-es típusú angiotenzin receptor (angiotensin II receptor type 2)
- BMP: Csont morfogénikus protein (bone morphogenetic protein)
- C3M: III-as típusú kollagén (peptide of helical collagen type III degradation)
- CTGF: Kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor)
- DAG: Diacil-glicerol (diacylglycerol)
- DKA: Diabéteszes ketoacidózis (diabetic ketoacidosis)
- DKD: Diabéteszes vesebetegség (diabetic kidney disease)
- DM: Diabétesz mellitusz (diabetes mellitus)
- ECM: Extracelluláris mátrix (extracellular matrix)
- EndoMT: Endotéliális-mezenhimális tranzíció (endothelial to mesenchymal transition)
- EMT: Epitéliális-mezenhimális tranzíció (epithelial–mesenchymal transition)
- FN: Fibronektin (fibronectin)
- GFR: Glomeruláris filtrációs ráta (glomerular filtration rate)

HHS: Hiperozmoláris, hiperglikémiás állapot (hyperosmolar hyperglycemic state)

IDF: Nemzetközi Diabetológiai Társaság (International Diabetes Federation)

LAP: Latency-associated peptide

LTBT: Látens TGF- β -kötő protein (latent TGF- β binding protein)

MCP1: Monocita kemoattraktáns protein 1 (monocyte chemoattractant protein 1)

MMPs: Mátrix metalloproteinázok (Matrix metalloproteinases)

PDGF: Vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)

PDGFR: PDGF receptor

PKC: Protein kináz C (Protein kinase C)

RAAS: Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin–angiotensin–aldosterone system)

ROS: Reaktív oxigén vegyületek (reactive oxygen species)

SMAD: Jelátviteli útvonal (sma and mad related family)

STZ: Streptozotocin

T1DM: 1-es típusú diabétesz mellitusz

T2DM: 2-es típusú diabétesz mellitusz

TGF: Transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)

TIMP: Mátrix metalloproteinázok szövettani inhibitora (tissue inhibitor of metalloproteinases)

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

WHO: World Health Organization

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

Ábrák:

1. ábra: Az egészséges vese, valamint a diabéteszes vesebetegség (DKD) során jelentkező strukturális változások
2. ábra: Mezangiális mátrix expanszió
3. ábra: A klasszikus renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kaszkád
4. ábra: A vese intersticiális fibrogenezisének főbb eseményei
5. ábra: TGF- β jelátviteli útvonala
6. ábra: PDGF fehérjecsald jelátviteli útvonala
7. ábra: CTGF főbb szabályozó funkciói
8. ábra: *In vivo* kezelési protokoll
9. ábra: Mezangiális mátrix szövet kiterjedése kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben
10. ábra: Kollagénben dús kötőszöveti lerakódás kiterjedése kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben
11. ábra: Kollagén szövet kiterjedése kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben
12. ábra: Fibronektin kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben
13. ábra: α -SMA lokalizációja kontroll és kezeletlen diabéteszes állatok veséiben
14. ábra: α -SMA lokalizációja és mennyisége, PDGF- β lokalizációja kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben
15. ábra: TGF β , PDGF és CTGF mRNS expresszió kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban
16. ábra: MMP2 és TIMP1 mRNS expresszió kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban
17. ábra: PDGF fehérje mennyisége 35mM glükóz kezelést követően a proximális tubulus sejtekben
18. ábra: PDGF mRNS expresszió 24 órás 35mM glükóz és RAAS-gátló kezelést követően a proximális tubulus sejtekben

Táblázatok:

1. táblázat: Az 1-es és 2-es típusú diabétesz mellitusz (DM) összehasonlítása
2. táblázat: A DM diagnosztikai határértékei
3. táblázat: Kezelés során alkalmazott gyógyszerek dózisa
4. táblázat: A HK-2 sejtek kezelése során alkalmazott glükóz, mannitol, és RAAS-gátló gyógyszerek koncentrációi
5. táblázat: A reverz transzkripció polimeráz-lánreakció során használt gének és primerek
6. táblázat: Lízis puffer összetétele
7. táblázat: Laemli puffer összetétele
8. táblázat: Kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok vérnyomás értékei a két hetes kezelési periódus végén
9. táblázat: Kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok metabolikus laborparaméterei
10. táblázat: Renális laborparaméterek kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban

1. BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR

1.1. Diabétesz mellitusz (DM)

A diabétesz mellitusz (DM) korunk egyik legnagyobb népegészségügyi problémája, melynek prevalenciája jelentősen növekszik. A Nemzetközi Diabetológiai Társaság (IDF) adatai szerint ma 463 millió ember él cukorbetegséggel, de 2045-re ez a szám a 700 milliót is elérheti[1]. Magyarországon jelenleg nincs felnőtt diabétesz regiszter, azonban az IDF 2011-es adatai szerint a DM előfordulása a magyar felnőttek (20-79 évesek) körében 7,6%. Továbbá az IDF adataival összhangban, a magyar epidemiológiai adatok alapján 7,21% az ismert diabétesz és 1,44% a fel nem ismert diabétesz[2] magyarországi előfordulása, illetve a gyógyszeresen kezelt 2-es típusú diabétesz prevalenciája 2016-ban 7,94% volt[3]. A betegség jelentőségét jól jelzi, hogy az egészségügyi költségek 13%-át a DM és szövődményei okozta elváltozások kezelése teszi ki[4].

A DM olyan anyagcsere-betegség, amelynek központjában a szénhidrát-anyagcsere zavara áll, de a kórfolyamat a zsír- és a fehérje-anyagcserére is hatással van. A cukorbetegség alapvető oka az inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya, illetve az inzulinhatás elmaradása[5].

A DM kórlefolyása alapján két fő típust különböztetünk meg, az 1-es típusú (T1DM, oka az inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya) és 2-es típusú (T2DM, oka az inzulinhatás elmaradása, inzulinrezisztencia) DM-et (1. táblázat). A betegek döntő többsége (85-90%) a T2DM-be tartozik, ahol a betegség leginkább felnőttkorban jelentkezik, gyakran a metabolikus szindróma részjelenségeként, elhízással, hipertóniával társulva.

1. táblázat: Az 1-es és 2-es típusú diabétesz mellitusz (DM) összehasonlítása

Szemponatok	1-es típusú diabétesz mellitusz	2-es típusú diabétesz mellitusz
Oka	az inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya	az inzulinhatás elmaradása, inzulinrezisztencia
Életkor	bármely életkor, gyakrabban gyerek- vagy fiatalkor	felnőttkor (40. életévtől), a korhatár csökken
Testsúly	általában normális	normális vagy elhízott
Kialakulása	általában gyors	lassú
Béta-sejtek száma	kevesebb mint 10%	kezdetben normális, később csökken
Inzulin	alacsony vagy teljesen hiányzik	a betegség elején magas
Autoantitestek	igen	nem
Ketózisra való hajlam	kifejezett	nem jellemző
Inzulinterápia	szükséges	nem feltétlenül szükséges

Számos más alcsoport is létezik, melyek kialakulását egyéb tényezők is befolyásolhatják pl. gesztációs diabétesz, a béta-sejt-működés genetikai zavarai (MODY, MIDD), az inzulinhatás genetikai zavarai, gyógyszerek és kémiai anyagok, infekciók, melyek részletes tárgyalásától a dolgozatban eltekintünk.

1.1.1. DM diagnózisa

A WHO ajánlásában a kórjelző értékű vércukor-küszöbértékek meghatározásánál elsősorban azt veszik figyelembe, hogy mely vércukorszintek fölött jelentkeznek halmozottan a cukorbetegség idült szövődményei[5]. A glükózsztint mérhető a plazmában, vagy a szérumban. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy 11-13%-kal magasabbak a vérplazmában mért értékek, mint a vérben mért cukorszint[6].

Egészséges szervezetben az éhomi vércukorszint 4,0–6,0 mmol/l között van, és az étkezést követően nem haladhatja meg a 8,0 mmol/l-t.

A DM kórisméjének megállapítására egyaránt használható a random (a nap bármely szakában mért) vércukorérték ($\geq 11,1$ mmol/l), az éhomi vércukorszint ($\geq 7,0$ mmol/l), vagy az orális glükóztolerancia-teszt (OGTT) során a két óra elteltével mért vércukor ($\geq 11,1$ mmol/l) [5].

A cukorbetegség klasszikus tünete a poliúria (vizelet mennyiségének megnövekedése), a polidipszia (fokozott folyadékfelvétel az állandó szomjúság érzés miatt) és az egyéb okokkal nem magyarázható fogyás. A klasszikus tünetek főként a T1DM-re jellemzőek, T2DM esetében akár évtizedekig tünetmentesen alakulhat a betegség és gyakran csak szűrővizsgálat vagy egyéb kórállapot kapcsán kerülhet felismerésre.

A klasszikus tünetek megléte már utalhat DM-re, azonban a diagnózis megállapításához elengedhetetlen a vércukorszint meghatározása. DM állapítható meg, ha az éhomi (az utolsó energia-felvételt követően minimum 10 óra múlva mért) vércukor kóros, azaz értéke vénás plazmában, enzimatikus módszerrel meghatározva eléri, vagy meghaladja a 7,0 mmol/l értéket, vagy étkezés után bármely időpontban mért (random) vércukorszint eléri, vagy meghaladja a 11,1 mmol/l értéket. Klasszikus tünetek hiányában éhomi vércukorszint értéke két különböző alkalommal mérve eléri, vagy meghaladja a 7,0 mmol/l értéket vagy az OGTT kapcsán az éhomi vércukor eléri vagy meghaladja a 7,0 mmol/l értéket és/vagy a 120 perces érték eléri vagy meghaladja a 11,1 mmol/l értéket (a kóros terhelési eredmény egy másik időpontban végzett méréssel megerősítendő).

Elsősorban az Amerikai Egyesült Államokban alkalmazott módszer, azonban az utóbbi pár évben (2017-es[7] és 2020-as[8] MDT irányelv alapján) Magyarországon is elfogadott eljárás, a glikált hemoglobin (HbA_{1c}) mérése alapján diagnosztizálni a cukorbetegséget. A glükózhoz a HbA_{1c} lassan és irreverzibilisen kapcsolódik, kötődve a hemoglobin egyik vagy mindkét béta-láncának N-terminálisán lévő valinjához. A HbA_{1c} az utóbbi 2-3 hónap vércukorértékeinek átlagát tükrözi, és 6,5% feletti érték esetén beszélünk cukorbetegségről[9].

A küszöbértékek a következők: $HbA_{1c} \geq 48$ mmol / mol ($\geq 6,5$ %) két mérés alkalmával vagy $HbA_{1c} \geq 48$ mmol/mol egy alkalommal és az éhomi plazma glükóz koncentráció (FPG) 7 mmol/l vagy annál nagyobb[6]. (2. táblázat)

2. táblázat: A DM diagnosztikai határértékei

Éhomi vénás plazma glükóz koncentráció (FPG) határértékek		A DM diagnózisa klinikai tünetek esetén	
Normál vércukorszint	4,0 - 6,0 mmol/l	Orális glükóztolerancia-teszt (OGTT) "2 órás érték"	≥ 11,1 mmol/l
Emelkedett éhomi vércukorszint	6,1 - 7,0 mmol/l		
DM diagnózisa éhomi vércukorszintből	> 7 mmol/l	Glikált hemoglobin koncentráció (HbA_{1c})	≥ 6.5%

1.1.2. DM szövődményei

Mind a T1DM mind a T2DM számos szerv működését károsíthatja. Szövődményeik hagyományos felosztás szerint két csoportra oszthatóak: heveny és idült, az utóbbi kis-ér (mikroangiopátiás), illetve nagy-ér (makroangiopátiás) eredetű szövődményekre osztható.

A mikroangiopátiás (mikrovaszkuláris) elváltozások a kis erek (érátmérő < 500 µm, morfológiailag prekapilláris arteriolák és kapillárisok) károsodása következtében kialakuló szövődmények. Kitüntetett helyei a retina (retinopátia), a vese (diabéteszes vesekárosodás, melyet részletesebben a következő fejezet tárgyal), az idegszövet (neuropátia) és a kardiomiociták (kardiopátia). A mikrovaszkuláris elváltozások meghatározó kóroki tényezője az elégtelen glikémiás kontroll, melynek következtében alternatív anyagcsere utak kerülnek előtérbe, reaktív oxidatív termékek halmozódnak fel, előrehaladott glikációs végtermékek (AGEs) képződnek és a nitrogén monoxid termelődés csökken.

A diabéteszes retinopátia a munkaképes lakosság látásvesztésének vezető oka, azonban a T1DM-ben nem kell számolnunk az előfordulásával a megjelenésétől eltelt első öt éven belül. Létrejöttében a kívánttól elmaradt glikémiás kontroll a legjelentősebb tényező, mindemellett kiváltó szerepe van az intraokuláris áramlási nyomás növekedésének és a megnövekedett vérzsírértékeknek is.

A diabéteszes neuropátia a makroangiopátia mellett a DM másik, a szervezet egészét érintő betegség. Az esetek egy részében közvetlenül meghatározza az alapbetegség kimenetelét (végzetes ritmuszavarok), máskor az érintett személy szokásos életvitelét akadályozó (diabéteszes láb), vagy az életminőséget rontó tényező (fájdalmas szenzoros neuropátia). A diabéteszes neuropátia a cukorbetegség perifériás és autonóm idegelemeket érintő szövődményeinek – klinikai tüneteknek, vagy csak célzott vizsgálatokkal felismerhető elváltozásoknak – az összefoglaló neve.

A makroangiopátiás szövődmények az ateroszklerózis különböző formáinak kialakulását jelentik. A cukorbetegség mindkét fő típusában a szív- és érrendszeri halálózása a vezető szerep. Ma általánosan elfogadott az a megállapítás, hogy a T2DM-ben észlelt keringési kockázat akkora, mint az infarktuson már átesett egészséges anyagcseréjű (nem cukorbeteg) személy esetében.

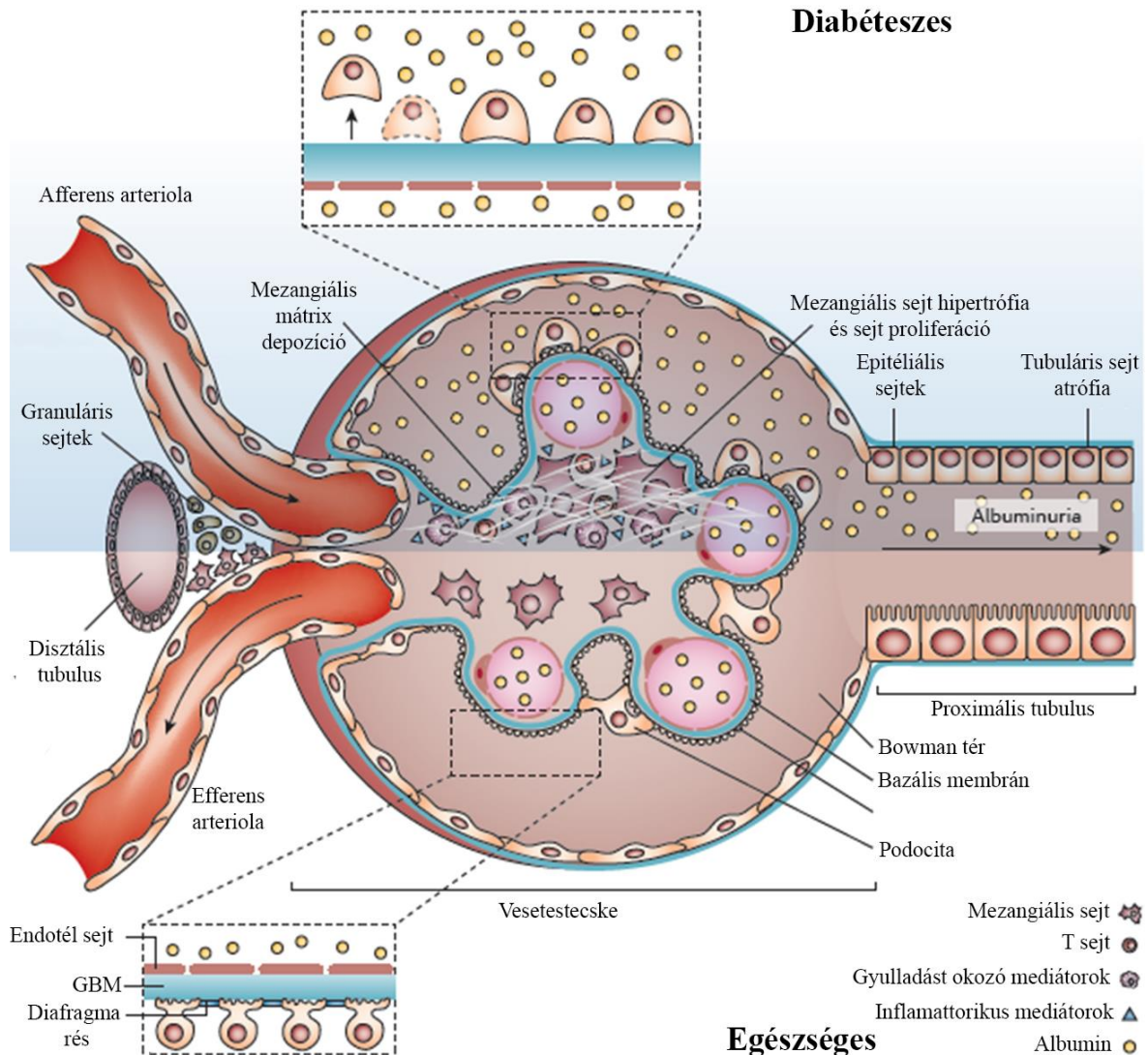
1.2. Diabéteszes vesebetegség (DKD)

A diabéteszes vesebetegség (DKD) a krónikus veseelégtelenség vezető oka[10]. Gyógyítására nincs hatékony terápiás megoldás, a jelenlegi kezelések csak lassítják a progressziót.

A DKD a T1DM betegek 30%-ánál, a T2DM betegek 40%-ánál jelentkezik[11, 12].

A DKD során a felgyorsult vesefunkció vesztes mellett kóros fehérje-, vagy albuminvizelés áll fenn, illetve a vese hisztológiai vizsgálatokor DKD-ra utaló eltérések láthatóak (3.3. fejezet)[13].

A hisztológiai elváltozások során először a megemelkedett extracelluláris mátrix (ECM) szekréció és sejtmeagnagyobbodás következtében létrejövő mezangiális mátrix expansió figyelhető meg. Elektronmikroszkóppal kimutatható a bazál membrán megvastagodása és a podociták számának csökkenése[14]. A glomeruláris filtráció funkcionális integritásáért a podociták felelnek, melyek strukturális épsége sérül a DKD során és ez proteinúriát (fehérjevizelést) eredményez[14, 15]. A vesekárosodás előrehaladtával glomeruloszklerózis és az ECM fehérjék – például kollagén I, III, IV és fibronectin - nagymértékű felhalmozódása figyelhető meg, ami fibrotikus elváltozáshoz vezet (1. ábra).



1. ábra: Az egészséges vese, valamint a diabéteszes vesebetegség (DKD) során jelentkező strukturális változások. Az ábra felső része a diabéteszes, az alsó része az egészséges vesetestecske állapotát mutatja. DKD során a glomeruláris bazális membrán megvastagodása, a mezzangiális sejtek számának növekedése és a podocita lábnyúlványok szerkezetének megváltozása figyelhető meg. Thomas ábrája alapján módosítva [16]

A T1DM betegek esetében a glomeruláris filtrációs ráta (GFR), albuminúria és a magas vérnyomás erősen korrelál a mezzangiális mátrix expansióval, viszont a korreláció kevésbé erős a glomeruláris bazál membrán megvastagodásával [17]. A T2DM-ben szenvedő betegek veseműködésének változása hasonló a T1DM-ben észleltekhöz, azonban heterogénebb képet mutat és kevésbé prediktív módon kapcsolódik a klinikai kórképekhez [18].

A DKD kórlefolyását öt stádiumra lehet felosztani[19]:

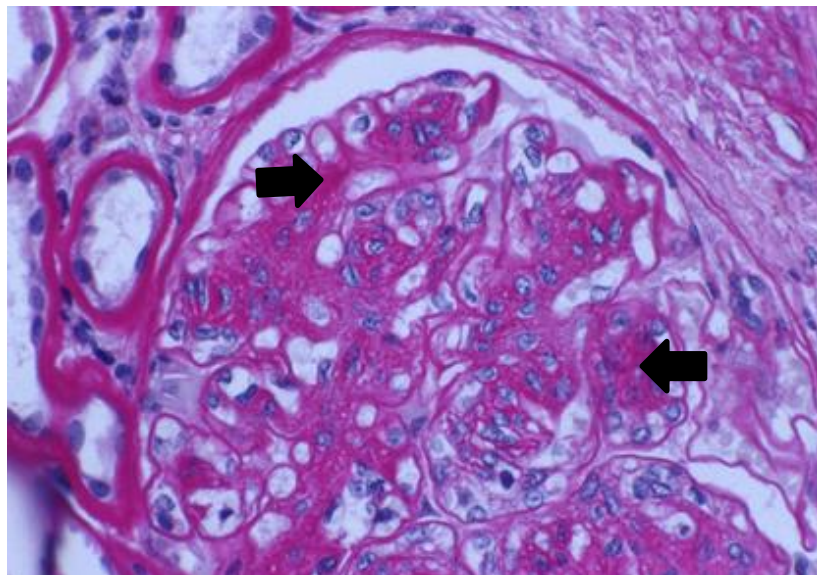
1. stádium: Hiperfiltráció (GFR növekedés) és hipertrófia (a veseszövet megnagyobbodása figyelhető meg, albuminúria-mikroalbuminuria még nem mutatható ki).
2. stádium: Kialakulása több évig elhúzódik, átmeneti mikroalbuminuriás periódusok jellemzik.
3. stádium: Stabil albuminúria-mikroalbuminuria (30-300 mg/nap albuminürítés), valamint GFR csökkenés figyelhető meg.
4. stádium: Albuminúria-makroalbuminuria (>300 mg/nap albuminürítés) és jelentős GFR veszteség jellemzi.
5. stádium: Végstádiumú veseelégtelenség, a GFR <15 mL/min/1.73 m². A működő nefronok száma jelentősen csökken, művesekezelés indokolt.

A DKD tipikus kórlefolyását a folyamatos albuminúria-mikroalbuminuria megjelenése, proteinuria kialakulása és az éveken át tartó, egyre súlyosabb renális diszfunkció jellemzi[20].

A jelenlegi kezelési stratégiák csak lassítják a vesekárosodás progresszióját, azonban a krónikus veseelégtelenség kialakulását nem tudják meggátolni[21].

1.3. DKD szövettana

A DM során fellépő hiperglikémia, hiperfiltráció, glomeruláris hipertrófia és az ezzel együtt járó GFR csökkenés következtében hisztopatológiai elváltozások alakulnak ki a vesében. Súlyossági fokuk alapján ezek a szövettani elváltozások öt osztályba sorolhatóak [22]. A DM okozta hiperglikémia és glomeruláris hipertrófia következményeként először a glomeruláris bazálmembrán (GBM) megvastagodása (I. osztály) következik be, amely a DM kialakulását követően 1,5-2,5 évvel detektálható[23]. A GBM megvastagodása kezdetben nem feltétlenül jár együtt a glomeruláris hemodinamika felborulásával[24], azonban később ez a megvastagodás felborítja az ECM szintézisének és lebomlásának egyensúlyát[25], melynek következtében az ECM felhalmozódik a glomerulus mezangiumában. Ez a felhalmozódás a kapilláris lumen átmérőjének, azaz a filtrációs felszín folyamatos csökkenését eredményezi[26]. A mezangiális mátrix expanszió (2. ábra) előbb enyhébb formában van jelen (II. osztály), amikor is a mezangiális terület kisebb, mint egy glomerulus kapilláris lumene. Amennyiben a mezangiális terület nagyobb, mint egy glomerulus kapilláris lumene, a mezangiális mátrix expanszió súlyosabb formájáról beszélünk (III. osztály). A GFR csökkenése és a mezangiális mátrix expanszió súlyossága között szignifikáns összefüggés van[27-29].



2. ábra: Mezangiális mátrix expanszió. A perjódsvav-Schiff-reakcióval jelölt glomeruluson nyíl jelöli a püspöklila színű mezangiális teret (saját ábra).

Ezt követően Kimmelstiel-Wilson léziók jelennek meg a mezangiális térben (IV. osztály). A Kimmelstiel-Wilson léziók kerekded-ovális, fokális, lobuláris acelulláris elváltozást mutatnak[30]. Végül, amikor a glomeruloszklerózis a vesebiopszia több mint 50%-ában megfigyelhető, előrehaladott diabéteszes glomeruloszklerózisról beszélünk (V. osztály).

Egyéb léziók is előfordulhatnak a DM kórlefolyása során, mint például: a Bowman-kapszula kapszuláris csepp elváltozása, az afferens és az efferens arteriola hialinizációja, a glomeruláris kapillárisok fibrin „sapka” elváltozása[31]. Súlyos glomeruláris károsodás esetén a podociták GMB-ről való leválása is gyakran megfigyelhető. Mivel a podociták alapvető építőegységei a glomeruláris filtrációs barrierek, sérülésük albuminuriához/proteinuriához, szegmentális- és globális-glomeruloszklerózishoz vezethet[32].

1.4. DKD patomechanizmusa

A DKD egy többlépcsős összetett folyamat, melynek kialakulásához több év szükséges. A DKD patomechanizmusában meghatározó szerepe van az endotél sejteknek, melyek nem képesek a magas glükóz szint hatására megemelkedett glükóz transzport gátlására[33]. A nagy mennyiségű intracelluláris glükóz olyan patogenetikus folyamatokat indít be, melyek hozzájárulnak a DKD kialakulásához[16]. A megemelkedett glükóz szint külső és belső sejtkárosodáshoz vezet.

A külső sejtkárosodás nagyrészt a nem enzimátikus glikációval képződő glikációs végtermékek (AGEk) felhalmozódásának következménye. Az AGEk kialakulásakor a glükóz szabad gyökké alakul, ami kémiaiilag sokkal reaktívabb, mint a kiindulási molekula. Az ECM fehérjéi felhalmozódnak az AGEk keresztkötéseiben, ezáltal mérséklék[34] az ECM degradációját[35]. Ennek következtében az ECM szintézis-degradáció biológiai egyensúlya felborul, az ECM felhalmozódik és a bazál membrán megvastagszik. Az AGEk a glomeruláris mezangiumban felhalmozódva különböző növekedési faktorok, úgymint transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) és vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) megemelkedését idézik elő. A

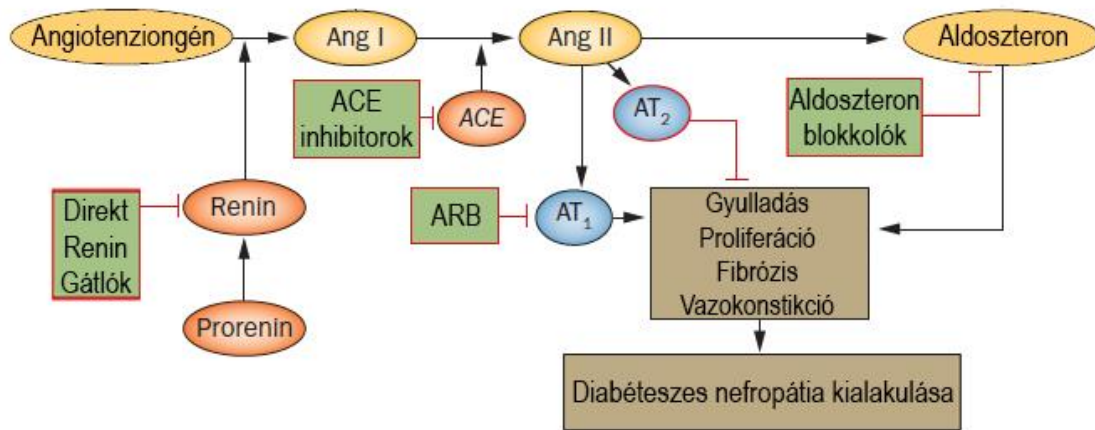
glomeruláris és tubulointersticiális elváltozásokat ezek a növekedési faktorok is elősegítik[36]. A diabéteszes vesében számos sejttípuson, pl. podocitákon is fokozódik a szolubilis AGEs receptorának (RAGE) mennyisége[37][38]. A fokozott RAGE aktivitás elősegíti az intracelluláris reaktív oxigén vegyületek (ROS) termelését[39], melyek intracelluláris károsodást váltanak ki.

A belső glükotoxicitás függ attól, hogy az adott szövet/sejttípus milyen glükóztranszporterrel rendelkezik. Az inzulin dependens glükóz transzportert kifejező sejtekben (pl.: simaizom sejtek), csökkentett a glükóz intracelluláris áramlása, emiatt ezek a sejtek részben védettek a glükóztoxicitástól. A vesében számos sejttípus található, melyek különböző glükóz transzporter családba tartozó fehérjéket expresszálnak[40]. Az endotél sejtek olyan glükóz transzportereket expresszálnak, amelyek függetlenek az inzulintól, így ezek a sejtek nem képesek magas glükóz szint mellett alul szabályozni a glükóztranszportot. Ennek következtében az endotélsejtek sérülékenyebben reagálnak a megemelkedett glükóz szintre.

A DKD kialakulásában központi szerepet tölt be a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) aktiválódása is, mely emelkedett angiotenzin (Ang) II szintet eredményez, és ezáltal az efferens arteriola vazokonstriktójához vezet. A megemelkedett AngII mennyiségi összefüggést mutat a fokozott albuminúriával és nefropátiával[15, 41]. Emellett a RAAS folyamatos aktivációja, a vese arteriolák összehúzódása révén, megnöveli a perifériális ellenállást, ami a glomeruláris kapillárisok nyomásának megemelkedéséhez, proteinuriához és fokozódó oxidatív stresszhez vezet[42] (NADPH oxidáz jelátviteli útvonalon keresztül). Mindezek következtében endoteliális diszfunkció alakul ki, amely elősegíti a mezangiális sejtek proliferációját és a proinflammatorikus jelátviteli útvonalak aktiválódását[43, 44].

1.5. Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A RAAS alapvető funkciója a vérnyomás, ásvány- és vízháztartás szabályozása, valamint a vese homeosztázisának fenntartása. A klasszikus RAAS kaszkád (3. ábra) első lépése a prorenin szintézise. A prorenint a juxtaglomeruláris sejtek expresszálják a csökkenő vértérfogat hatására[45].



3. ábra: A klasszikus renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kaszkád. Zöld téglalap jelöli a RAAS rendszer gátlásának lehetőségeit: Direkt renin gátlók (pl.: Aliskiren), ACE inhibitorok (pl.: Ramipril), ARB: angiotenzin receptor blokkolók (pl.: Lozartán), és aldoszteron antagonisták (Pl.: Eplerenon, Spironolakton). Roscioni SS ábrája alapján módosítva[46]

A juxtaglomeruláris apparátusban a proreninből renin képződik, mely proteolitikus hasítás révén a májban termelődő angiotenzinogénből AngI-et alakít ki. Az AngI átalakulását az AngII-konvertáló enzim (ACE) katalizálja AngII-vé. Az AngII egy pleiotropikus hormon, mely direkt hatással van az arterioláris simaizomsejtekre. Az alacsony vértérfogat az erek összehúzódását idézi elő, növelve a vérnyomást. A vesében az efferens arteriolák összehúzódása nagyobb mértékű, mint az afferens arterioláké, ezzel segítve a vért a glomerulusba, melynek következtében a glomeruláris nyomás megemelkedik. Az efferens arteriolák ezen tulajdonsága a GFR fenntartásában igen fontos, mert ezáltal a vér filtrációja akkor is folyamatos, amikor a vesében csökkent a véráramlás[47]. Az AngII az aldoszteron szekréciót is befolyásolja a mellékvesekéreg zona glomerulosa régiójában, elősegítve a Na^+ és vízvisszatartást.

Az AngII a RAAS egyik fő mediátora, két receptora van: 1-es (AT1R) és 2-es (AT2R) típusú receptor[47]. A vesesejtekben az AngII számos profibrotikus faktor mennyiségét megemeli, melyek sejtproliferációt, ECM felhalmozódást, gyulladást és végeredményben vesefibrózist eredményeznek. Ezeket a folyamatokat az AngII nagyrészt az AT1R-en keresztül mediálja[48]. Emellett AT1R mediálta folyamat a vazokonstrikció, aldoszteron felszabadulás, vaszkuláris remodelling és a megnövekedett oxidatív stressz is. Az AngII megemeli a TGF béta expressziót[49], továbbá befolyásolja a másodlagos hírvivő

(például a diacil-glicerol (DAG) és ROS-ok[50]) molekulák mennyiségét is. Az AT2R aktivitása ellentétes hatású, mint az AT1R-é és például vazodilatációt eredményez.[51]

A RAAS gátlása bizonyítottan renoprotektív hatású[52, 53], csökkenti a krónikus veseelégtelenség progresszióját, és ez által enyhíti a proteinurea mértékét[52-55].

1.6. DKD kezelése

Mind a T1DM mind a T2DM betegeknél a betegség korai szakaszától alkalmazott hosszú távú, intenzív glikémiás kontroll csökkenti a DKD kialakulásának valószínűségét[56, 57] és a mikro- és makroalbuminúria előfordulását[58, 59]. A DKD kialakulását követően a glükóz, lipid és vérnyomás kontroll, a megfelelő diéta és életmód kialakítása lassíthatja a betegség progresszióját[60, 61].

A jelenlegi ajánlások szerint a DKD terápiájában a RAAS-gátlók, monoterápiában az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) inhibitorok vagy ATR1 blokkolók (ARB) az elsődlegesen választandó szerek. Ezek a gyógyszerek lassítják a mikroalbuminúria kifejlődését, a DKD progresszióját, továbbá csökkentik a szív- és érrendszeri mortalitást a cukorbetegeknél[62].

A közelmúltban elvégzett vizsgálatok megerősítették, hogy a proteinúria mértéke jelentősen csökken egyéb RAAS blokkoló szerek (például aldoszteron vagy renin antagonisták) használatával. Emellett az aldoszteron antagonistá spironolakton enyhíti a proteinúria mértékét a diabéteszes és nem-diabéteszes vesebetegségben is[63, 64]. Összehasonlító vizsgálat kimutatta, hogy a spironolakton eredményesebben csökkenti a proteinúriát, mint az ACE-gátló enalapril. Egy másik aldoszteron-antagonista, az eplerenon, hasonlóan a spironolaktonhoz, jelentősen csökkenti a mikroalbuminúriát[65]. Ennek ellenére az aldoszteron antagonisták monoterápiás alkalmazása DKD kezelésében még mindig nem szerepel az ajánlásokban.

Linda F. Fried és munkatársai kimutatták, hogy ACE inhibitor (lizinopril) és ARB (lozartán) kombinációja csökkenti a proteinúria mértékét, azonban a kombinált kezelést kapó betegek körében a miokardiális infarktusok száma magasabb volt, mint a monoterápiában részesülő betegek esetében. Emellett a súlyos nemkívánatos események[66] és a hiperkalémia előfordulásának gyakorisága is magasabb volt a kombinációs kezelés esetében[67].

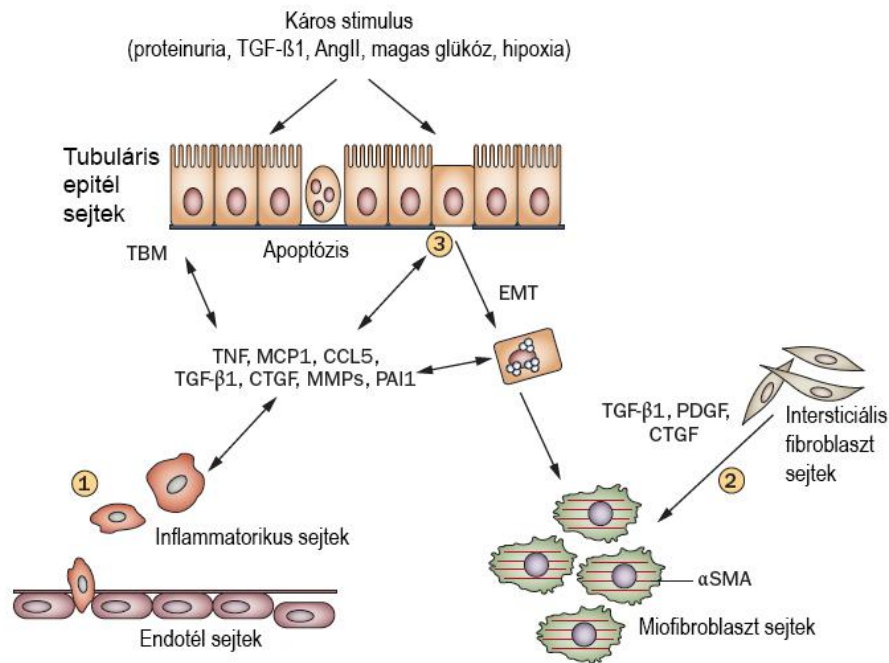
1.7. DKD és a vesefibrózis

A fibrózis a természetes sebgyógyulás része, a szervezetnek a sérülésre adott olyan válasza, mely során fenntartja az eredeti szöveti struktúrát és megőrzi a funkcionális integritást[68, 69]. A fibrózist gyulladás előzi meg, ami szükséges a gyógyulási folyamatokhoz: a parenhimális sejtek regenerációjához és a sérülés fibrotikus szövettel való kitöltéséhez[70]. A szöveti sérülésre adott gyulladásos válasz elindíthat egy természetes szövetgyógyulási folyamatot, vagy akár egy abnormális, kontrollálatlan szövetproliferációt is, ami a szövet struktúrájának és funkciójának az elvesztését okozva progresszív fibrózist eredményez.

A DKD következtében a fokozott mezangiális sejt proliferáció mellett intersticiális fibrózis is megfigyelhető. A folyamat során felborul az egyensúly az ECM összetevőinek (mint pl. I és III típusú kollagén, fibronectin, mátrix metalloproteinázok (MMP-k)[71]) szintézisében[72]. Az ECM felhalmozódása korrelál a vesekárosodás súlyosságával[73].

A tubuluintersticiális fibrózis legkorábban detektálható szövettani jelensége a fibroblasztok különböző forrásból történő felszabadulása, differenciálódása (miofibroblaszt sejtekké) és felhalmozódása az interstícumban. A miofibroblasztok kontraktilis sejtek, melyek nagy mennyiségű α -simaizom aktint (α -SMA) expresszálnak. A miofibroblasztok a fibroblasztok differenciálódásán kívül származhatnak a májcsillagsejtekből (ezek a sejtek aktiválódnak és miofibroblaszttá alakulnak), epithél sejtekből (EMT – epithéliális-mezenhimális tranzíció), endotéliumból (EndoMT – endotéliális-mezenhimális tranzíció), pericitákból és fibrocitákból is[73]. A miofibroblaszt sejtek megjelenésével párhuzamosan az ECM összetevők termelődése is fokozódik, melyek végül tubuláris atrófia kialakulását eredményezhetik (4. ábra)[74].

Ezeknek az eseményeknek az együttes hatására a veseparenchima erősen károsodik és a vesefunkciók nagymértékben romlanak.



4. ábra: A vese intersticiális fibrogenézisének főbb eseményei: 1. A fibrózis korai fázisában az endotél sejtek között inflammatorikus sejtek (főképp makrofágok és T-sejtek) jutnak át. 2. Miofibroblasztok differenciálódnak és aktiválódnak a helyi intersticiális fibroblasztokból. Ezek a miofibroblasztok termelik a mezangiális mátrix nagy részét a fibrózis során. 3. A tubuláris sejtek apoptózisa végül tubuláris atrófiához vezet. (Rövidítések: TNF: Tumor nekrozis faktor, CCL5: Chemokine ligand 5, PAI1: Plazminogén aktivátor inhibitor-1). Youhua Liu ábrája alapján módosítva[74]

Az extracelluláris mátrix összetevők képződése és lebomlása során specifikus pro-kollagén terminális fragmentumok és úgynevezett fehérje neo-epitópok keletkeznek, melyek a vizeletbe szekretálódnak[75]. A vizeletbe való szekretálódásuk alkalmassá teszi ezeket a molekulákat, hogy a vesefibrózis korai biomarkereként funkcionáljanak. A neo-epitóp fehérjék közé tartozik az MMP-9 mediálta III-as típusú kollagén degradációjából származó fragmentum (C3M)[76] és a IV-es típusú kollagén alfa3 lánc a tumstatin[77].

1.8. Vesefibrózis marker molekulái

A vesefibrózissal járó vesebetegségeket különböző növekedési faktorok (mint például a TGF- β , CTGF, PDGF) fokozott expressziója jellemzi. A TGF- β és a PDGF fibroblaszt

aktivációt vált ki, melynek következtében jelentős ECM termelés figyelhető meg[78]. A veseszövet fibrotikus átalakulása során a fibroblaszt sejtek *de novo*, nagy mennyiségű α -SMA-t expresszálnak és miofibroblasztokká differenciálódnak[79]. A miofibroblasztok felhalmozódása hozzájárul a kontrollálatlan ECM termeléshez a fibrózis kialakulása és progressziója alatt[80]. A miofibroblasztok detektálására leggyakrabban használt molekula az α -SMA fehérje[81].

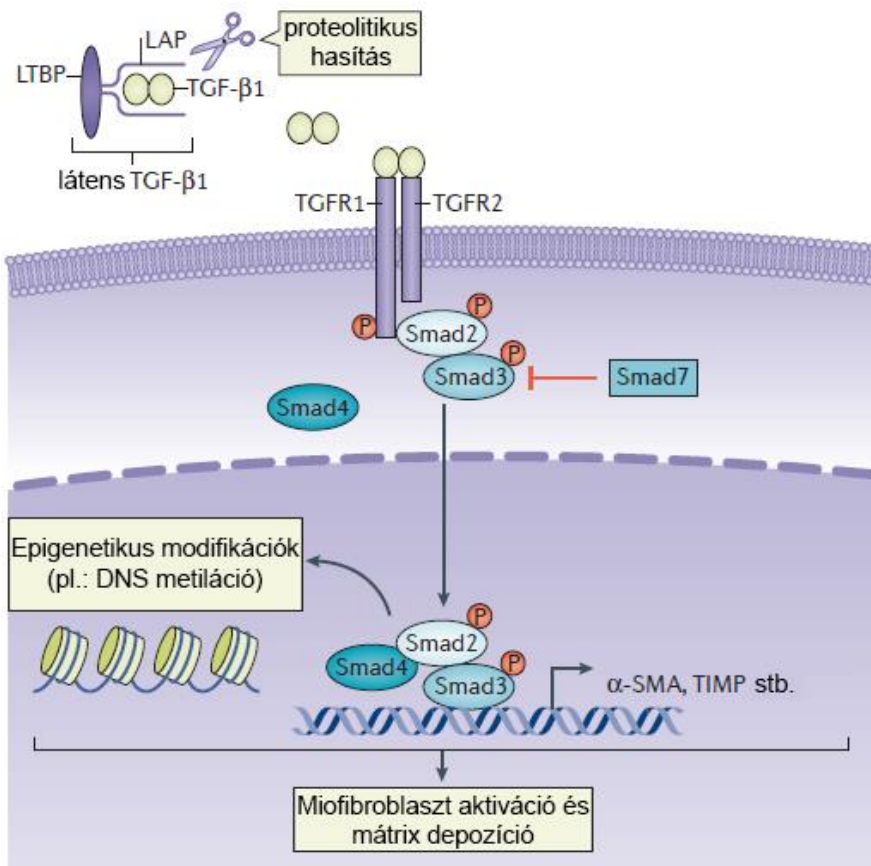
A fibronectin egy dimer fehérje, amely képes egyidejűleg kötődni a sejt felszíni receptorokhoz, kollagénekhez, proteoglikánokhoz és egyéb ECM összetevőkhöz[82]. Az intersticiális fibrózis során a mennyisége felhalmozódik (hasonlóan a kollagén I, III intersticiális mátrix fehérjéhez és a kollagén IV bazál membrán fehérjéhez)[83].

1.8.1. Transzformáló növekedési faktor β (TGF- β)

A TGF- β számos biológiai folyamatot szabályoz, többek között a sejtproliferációt, differenciációt és apoptózist. Továbbá, részt vesz az embriogenezis során a sejt fejlődési irányának meghatározásában[84]. Három izoformája létezik (TGF- β 1, 2, 3), melyek szekvenciája 60-80%-ban homológ[85]. A három izoforma közül csak a TGF- β 1 szerepe ismert a vesefibrózisban, melyet a vesében az összes sejt szintetizál[86]. Szintézise után, a prekursor TGF- β -hoz első lépésben egy latencia-asszociált fehérje (LAP) kapcsolódik. Ez az úgynevezett kis látens komplex az LTBP-hez (Latent TGF- β -binding protein) kötődik és nagy látens formában lesz jelen a célszövetben. Amikor TGF- β plazmin, reaktív oxigén gyökök vagy trombospondin-1 proteolitikus hasítással leválasztja az LTBP-ről és LAP-ról, a növekedési faktor aktívvá válik[87] és kiváltja a SMAD2 és a SMAD3 foszforilációját. A foszforilált SMAD2 és SMAD3 egy oligomer komplexet alkotva transzlokálódik a nukleuszba és különböző koaktivátorokkal és korepresszorokkal célgének transzkripcióját szabályozza[84] (5. ábra). Ilyen célgén például a SMAD7, melynek gátlása a miofibroblasztok aktivációjához, proliferációjához és ECM felhalmozódáshoz vezet[86].

A megemelkedett glükóz szint a Protein Kináz C (PKC) aktiválását is kiváltja, amely molekula *de novo* a diacil-glicerolból képződik[88]. A hiperglikémia fokozza a PKC

útvonal által szabályozott TGF- β 1 expressziót[89]. A TGF- β 1 aktiválásával, a PKC hatására fokozódik a mezangiális sejt ECM termelése[90]. A TGF- β 1 a polyol útvonalon is aktiválódhat. Ennek során az aldóz reduktáz a glükózt szorbitollá bontja, majd a szorbitol dehidrogenáz a szorbitolt fruktózzá alakítja át. A folyamat növeli a NADH/NAD arányát, ami oxidatív stresszhez, PKC aktivációhoz és végül TGF- β 1 aktivációhoz vezet[91].



5. ábra: TGF- β jelátviteli útvonala. A TGF- β aktiválódása után a sejtmagba jutva miofibroblaszt aktivációt és mátrix depozíciót indukál. Xiao-ming Meng ábrája alapján módosítva[92]

Számos vizsgálat alátámasztja a TGF- β 1 szerepét a vesefibrózisban. TGF- β 1 jelátviteli útvonal aktiválása VEGF és CTGF indukcióhoz vezet, melyek a TGF- β 1 parakrin effektorai és központi szerepet játszanak a GBM megvastagodásában, a podocita sérülés és a glomeruloszklerózis kialakulásában[93]. *In vitro* kísérletek kimutatták, hogy a TGF- β 1 nem csak az ECM expresszióját indukálja[94, 95], hanem a mátrix

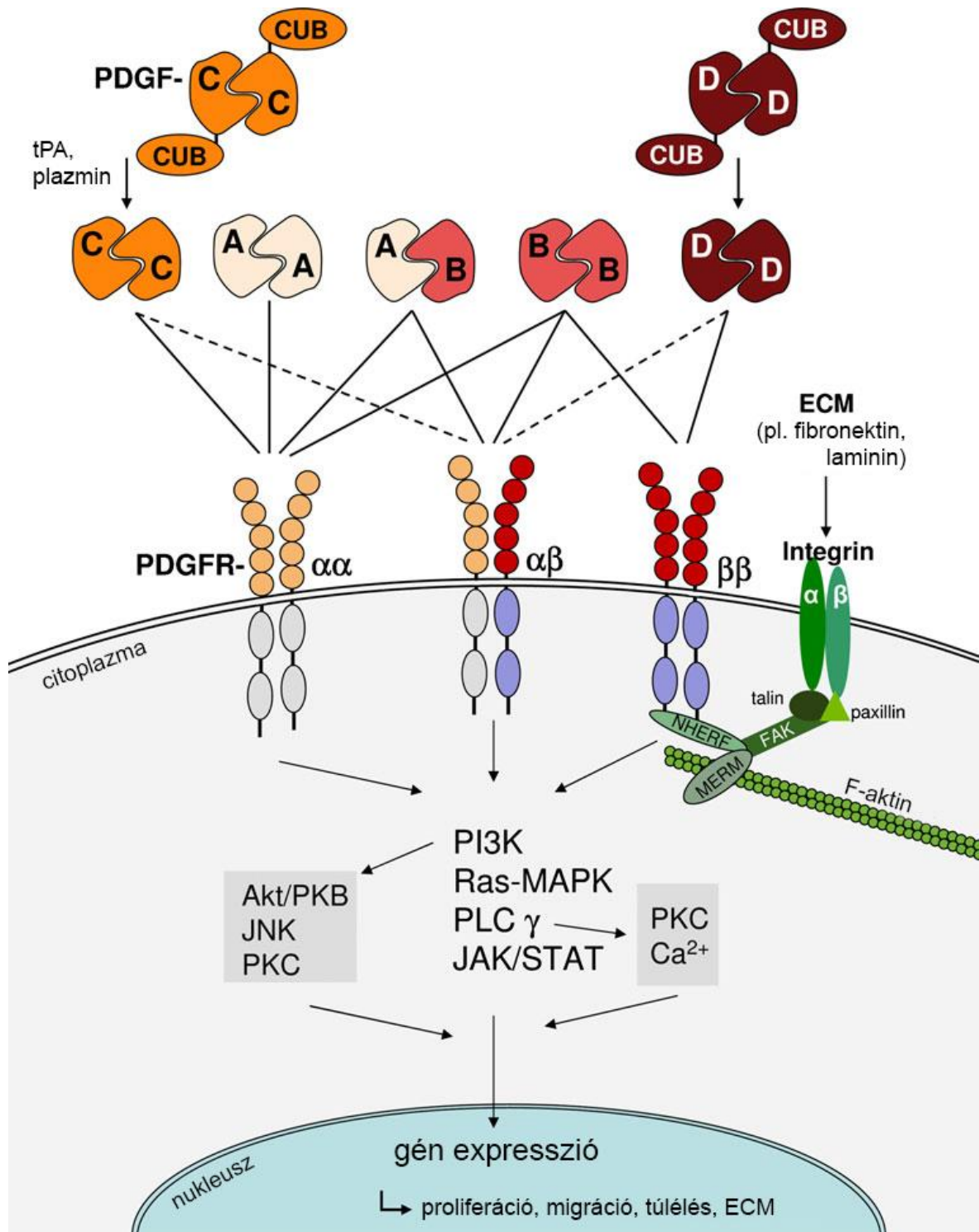
metalloproteináz (MMP) gátláson és MMP-k szövettani inhibitorainak (TIMP) aktiválásán keresztül annak gátlását is szabályozza[96, 97]

1.8.2. Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)

A PDGF-et először 1974-ben írták le Ross és mtsai, mint „vérlemezke függő szérum faktor, amely *in vitro* serkenti az arterioláris simaizom sejtek proliferációját”[98]. Ezen fehérjék részt vesznek az agy, tüdő, érrendszer és a vese embrionális fejlődésében[99], valamint a mezenhimális sejtek proliferációjának, differenciációjának és migrációjának szabályozásában.

A PDGF fehérje család 5 dimert tartalmaz (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC és DD), melyek különböző affinitással kapcsolódnak a PDGF receptorokhoz (PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ és PDGFR- $\beta\beta$). A PDGFR- $\alpha\alpha$ -hoz legnagyobb affinitással a PDGF-AA, és PDGF-CC kötődik. Ez a két dimer azonban alacsonyabb affinitással a PDGFR- $\alpha\beta$ -hoz is kapcsolódik. A PDGF-DD az egyetlen nagy-affinitású ligandja a PDGFR- $\beta\beta$ receptornak, A PDGF-CC kis affinitással a PDGFR- $\alpha\beta$ receptorhoz kapcsolódik[100].

A PDGF fehérjecsalád a mezangiális sejtbe jutva annak proliferációját, migrációját, túlélését és az ECM termelését szabályozza (6. ábra)[100]. A vesében levő mezenhimális sejtek, mint például glomeruláris mezangiális sejtek, intersticiális fibroblasztok, valamint a vaszkuláris simaizom sejtek PDGF α és β receptort expresszálnak. A vese fibrotikus elváltozása során mindkét PDGF receptornak és a receptor összes ligandjának a mennyisége megemelkedik[101]. T2DM-ben a PDGF-BB és a PDGFR- β mRNS megemelkedett expresszióját mutatták ki[102]. A PDGF fehérjecsalád a simaizomsejtekkel és a fibroblasztokkal létesít kapcsolatot, ezzel vaszkuláris elváltozásokat és fibrózist okozva[103].



6. ábra: PDGF fehérjecsald jelátviteli útvonala. A PDGF a receptorhoz való kötődést követően különböző jelátviteli útvonalon keresztül sejtproliferációt és migrációt, illetve ECM termelődést indukál. (Rövidítések: JNK: Jelátviteli útvonál - c-Jun N-terminal kinases, PI3K: Jelátviteli útvonál - Phosphoinositide 3-kinase, MAPK: Jelátviteli útvonál - Mitogen-activated protein kinase, PLC: Jelátviteli útvonál – Phospholipase, CJAK/STAT - Jelátviteli útvonál - Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, PKC: protein kináz C, Akt/PKB: protein kináz B, tPa: szövet típusú

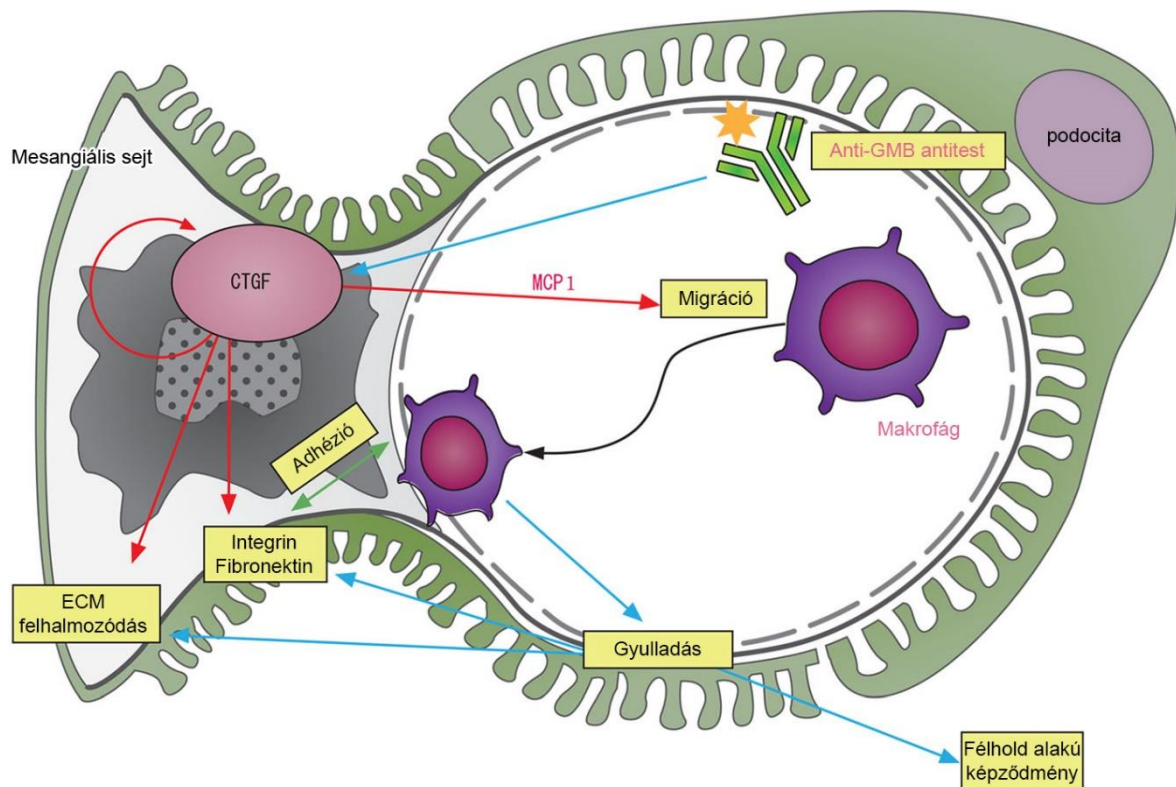
plazminogén aktivátor, MERM: citoszkéletáris összekötő fehérjék merlin és ezrin/radoxin/moezin családja, NHERF: Na^+/H^+ csere reguláló faktor, FAK: fokális adhézió kináz). Tammo Ostendorf ábrája alapján módosítva[100]

1.8.3. Kötőszöveti növekedési faktor (CTGF)

A CTGF egy 396 aminosavból álló 36-38 kDa nagyságú, cisztein gazdag fehérje, melyet először 1991-ben izoláltak, humán endoteliális sejtekből[104]. A fehérje a CCN 6 tagú matricelluláris protein család egyik tagja. A CCN5 kivételével, a CCN családba tartozó növekedési faktoroknak négy darab konzervált doménjük van[105]:

1. inzulinszerű növekedési faktort kötő domén (domén 1; IGFB),
2. von Willebrand faktor domén (domén 2; vWC),
3. trombospondin 1 típusú domén (domén 3; TSP1),
4. és a cisztein kötésre alkalmas domén (domén 4; CT).

A CTGF szabályozza a mezangiális sejtek ECM termelődését és a makrofág sejtek kemotaxisát és adhézióját (7. ábra) [106].



7. ábra: CTGF főbb szabályozó funkciói: A mezangiális sejtek ECM termelése és a makrofágok kemotexisa és adhéziója CTGF mediált folyamat. Anti-GMB antitest hatására a mezangiális sejtekben lévő CTGF up-regulálódik, amely MCP-1 expresszióhoz

vezet. Ez az MCP-1 expresszió makrofág osztódást és ECM fehérjetermelődést (integrin és fibronectin) eredményez. Naohiro Toda ábrája alapján módosítva[105]

A magas glükóz szint, AGEk és a TGF- β megemelik a CTGF fehérje mennyiségét [26]. *In vivo* kísérletek kimutatták, hogy az AngII-vel kezelt patkányokban, a CTGF a glomerulusokban, tubulusokban és az arteriolákban overexpresszálódik és ez a túltermelés fibronectin lerakódásokkal együtt járó tubuláris károsodást okoz [107, 108]. Továbbá DKD-s betegekben kimutatták, hogy a szérum CTGF, monocita kemoattraktáns protein 1 (MCP-1) és fibronectin szintek szignifikánsan megemelkednek. Ezen folyamatok jól mutatják a CTGF fehérjék jelentőségét a DKD patomechanizmusában[109]. ATR1 blokkolóval történő kezelés hatására csökken a CTGF és a fibronectin mennyisége, valamint a tubuláris károsodás mértéke[107].

Mindezen adatok alátámasztják, hogy a DKD patomechanizmusában központi szerepet tölt be a vesefibrózis folyamata, melynek kialakulásában számos citokin, MMP és növekedési faktor vesz részt. A növekedési faktorok közül az irodalomban a TGF- β vizsgálata van túlsúlyban, de felmerült a CTGF és PDGF szerepe is a DKD patomechanizmusában, melyek főként a fibroblasztok proliferációját és differenciálódását serkentik[110].

Munkánk során célul tűztük ki a DKD indukálta vesefibrózis patomechanizmusában szerepet játszó molekuláris útvonalak megismerését, különös tekintettel a növekedési faktorok szerepére, melyek jelentősen befolyásolják a betegség progresszióját. Mivel a DKD kezelésében a RAAS-gátlók az elsődlegesen választandó terápiás szerek, vizsgáltuk továbbá a RAAS-gátlók potenciális antifibrotikus hatását is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. DKD experimentális modelljében a RAAS-gátlók hogyan befolyásolják a funkcionális paramétereket, valamint a strukturális és fibrotikus szöveti elváltozásokat?
2. A RAAS-gátlók hogyan befolyásolják a vesefibrózis folyamatát, különös tekintettel a profibrotikus faktorok (TGF, PDGF, CTGF) expresszióját DKD experimentális állatmodelljében?
3. Az alkalmazott RAAS-gátlók közül melyik a legalkalmasabb a vesefibrózis progressziójának lassítására?
4. A PDGF központi szerepének igazolása a vesefibrózis folyamatában *in vitro* proximális tubulussejt-tenyészetben, magas glükóz kezelés után. Hogyan befolyásolják a RAAS-gátlók a proximális tubulussejtek PDGF termelését?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és kezelésük

Kísérleteinket 8 hetes, ivarérett, hím, Wistar patkányokon (Toxicoop Kft., Budapest, Magyarország) végeztük. Az állatokat állandó hőmérséklet (21 °C), páratartalom (75%) és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatok a vizsgálat során korlátlanul fogyaszthattak csapvizet és általános rágcsálótápot. A kísérleteket a Magyar Köztársaság állatvédelmi és állatkísérletekkel kapcsolatos törvényeinek (1998/XXVIII.) betartásával, a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelvei alapján végeztük el (Etikai engedély száma: PEI/001/380-4/2013).

A T1DM-et mesterségesen indukáltuk citrátban (0,1 M; pH=4,5) oldott, egyszeri, nagy dózisú streptozotocin (STZ, 65 mg/ttkg, Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) intraperitoneális injekcióval (*kezelés protokollt lásd: 8. ábra*). STZ nélküli citrát pufferrel a kontroll állatokat is kezeltük. A vércukor értékét Dcont Trend digitális vércukormérő készülékkel (77 Elektronika Kft, Budapest, Magyarország) farokvénából vett vérből mértük, 72 órával az injekció beadását követően. A patkányokat akkor tekintettük cukorbetegnek, ha háromszori random mérés után a perifériás vér glükóz koncentrációja meghaladta a 15 mmol/l értéket. Az ennél alacsonyabb vércukorszint esetén kizártuk az állatokat a további kísérletekből.

Megjegyzés: a digitális vércukorméréseken kívül a spektrofotométerrel történt szérumban glükóz és fruktózamin értékek is igazolták a diabéteszes modell validitását.

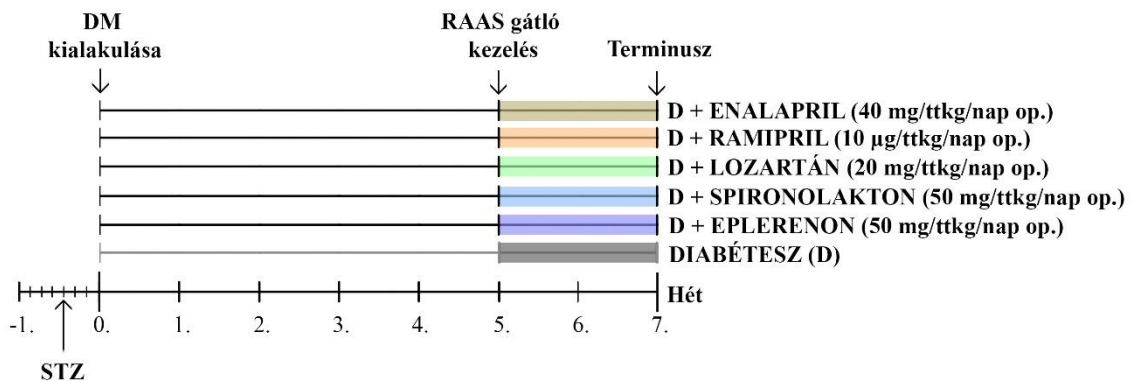
A T1DM kiváltását követő 5. héten az állatokat randomizálva csoportokba osztottuk (n=7-8 patkány/csoport) és 2 hétig *per os* izotóniás sóoldatban oldott RAAS-gátlókkal kezeltük.

A gyógyszerek dózisát (*3. táblázat*) irodalmi adatok és korábbi kísérleteink alapján[111] úgy választottuk meg, hogy az állatok vérnyomását ne befolyásolják, de ACE inhibitor, AT1R blokkoló és aldosteron antagonista hatásukat kifejtsék.

3. táblázat: Kezelés során alkalmazott gyógyszerek dózisa

Kezelés típusa	Beadott mennyiség
Kontroll – egészséges állatok	Izotóniás sóoldat, mint vivőanyag
Diabétesz (D) – diabéteszes állatok	Izotóniás sóoldat, mint vivőanyag
Diabéteszes állatok + Enalapril – ACE gátló	Izotóniás sóoldatban oldott 40 mg/ttkg/nap
Diabéteszes állatok + Ramipril – ACE gátló	Izotóniás sóoldatban oldott 10 µg/ttkg/nap
Diabéteszes állatok + Lozartán - angiotenzin-receptor blokkoló	Izotóniás sóoldatban oldott 20 mg/ttkg/nap
Diabéteszes állatok + Spironolakton – non szelektív aldoszteron antagonistá	Izotóniás sóoldatban oldott 50 mg/ttkg/nap
Diabéteszes állatok + Eplerenon - szelektív aldoszteron antagonistá	Izotóniás sóoldatban oldott 50 mg/ttkg/nap

A patkányokat a leölés előtti napon 24 órás vizeletgyűjtés céljából anyagcsereketrecekbe helyeztük. A kezelési protokoll végén az állatokat 60 mg/ttkg ketamin (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) és 5 mg/ttkg xilazin (Medicus Partner, Biatorbágy, Magyarország) oldatok elegyével altattuk el.



8. ábra: *In vivo* kezelési protokoll. Öt héttel a diabétesz mellitusz (DM) kialakulását követően két hétig kezeltük az állatokat renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) gátló szerekkel. STZ: streptozotocin.

Minden egyes állattól vérmintát vettünk, eltávolítottuk a veséket, megmértük a szervek súlyát, és a szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80°C-on tároltuk, vagy 4%-os formalinban fixáltuk a további vizsgálatokig.

3.2. Laboratóriumi paraméterek

Az állatok leölésekor vett vért 3600 rpm fordulatszámon, 6 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd szérumot izoláltunk. A szérumból fotometriás módszerrel meghatároztuk a szérum glükóz, kreatinin és karbamid paramétereit Hitachi-712 automatizált spektrofotométerrel (Roche Hitachi, Basel, Svájc). A 24 órás gyűjtött vizeletből meghatároztuk a kreatinin mennyiségét, majd a szérum és a vizelet kreatinin értékeiből kiszámoltuk a testsúlyra vonatkoztatott kreatinin-clearancet.

3.3. Vérnyomás mérés

Az állatok vérnyomását CODA standard farokmandzsettás vérnyomásmérő rendszerrel (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) kétszer mértük, a RAAS-gátló kezelés megkezdése előtt és a kísérleti periódus végén. A mérés altatásban, 3% izoflurán és szintetikus levegőelegy (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, UK) belélegeztetésével történt. Minden állatnál legalább három mérést végeztünk, majd meghatároztuk az artériás középértéket. Az artériás középnyomás értékét a szisztolés és diasztolés nyomás értékeiből számoltuk ki az alábbi képlet segítségével:

$$\text{Artériás középnyomás} = \frac{(2 * P_{\text{szisztolés}} + P_{\text{diasztolés}})}{3}$$

3.4. A vese hisztológiai analízise

A hagyományos hisztológiai vizsgálatokhoz a vesék középső részét 4%-os formalin fixálást követően paraffinba ágyztuk, majd 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteken perjódsva Schiff (PAS), hematoxilin-eozin, Masson trichom és PicroSirius Red festést végeztünk. A megfestett metszeteket digitális metszet szkennelő automatával (Pannoramic 250 Flash 3, 3D Histech Kft, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk, kiértékelésüket számítógépen végeztük.

3.4.1. Perjódsv-Schiff (PAS) festés

A PAS festés a makromolekuláris szénhidrátokat festi püspöklila színűre. Az eljárás során a makromolekuláris szénhidrátokban lévő alkoholos csoportokat perjódsv segítségével aldehiddé oxidáltuk, majd az aldehideket a Schiff-reagenssel láthatóvá tettük. A PAS festett metszeteken a mezangiális mátrix expansió mértékét vizsgáltuk. A mezangiális mátrix a glomerulus belsejében található erősen PAS-pozitív szövet, melynek felszaporodása a DKD kialakulására utal[71]. Állatonként 15 db 400x nagyítású digitális metszeten végeztük az értékelést.

A PAS-pozitív szövetet *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Incorporated San Jose, CA, USA) program segítségével kijelöltük, majd a kijelölt területet feketére, a fennmaradó területet pedig fehérre alakítottuk át. A fekete-fehér képeken *Scion image* (Scion Corporation, <http://scion-image.software.informer.com/>) szoftver segítségével elemeztük a fekete területek arányát a fehér területhez viszonyítva[112]. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá.

3.4.2. Masson-féle Trichome festés

A kollagénben dús kötőszöveti lerakódást Masson-féle Trichrome eljárással vizsgáltuk meg. A festési eljárás a sejtplazmát és a vörösvértesteket vörösre, a sejtmagokat feketére, a kollagént pedig kékre festi. Vesénként átlagosan 10 darab 200X-os nagyítású képet értékeltünk ki, mind a kéregből, mind a velőállományból (kizárva a glomerulusokat és a nagyobb ereket). A mintákat kódoltuk és megvizsgáltuk a tubulointersticiális fibrózis mértékét, melyre a kék színben megjelenő kollagén mennyiségéből következtettünk. Az *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Incorporated San Jose, CA, USA) program segítségével kijelöltük a kékekkel ábrázolódó fibrotikus szövetet, majd ugyanezen program használatával a kijelölt területet feketére, a fennmaradó részeket fehérre alakítottuk át. Az így kapott fekete-fehér képeken *Scion image* (Scion Corporation, <http://scion-image.software.informer.com/>) szoftver segítségével elemeztük a fekete területek arányát a fehér területhez viszonyítva[112]. A kontroll csoport

eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá[111].

3.4.3. Fibronektin immunhisztokémiai jelölés

A xilolban deparaffinizált 5 µm vastag metszeteket felszálló alkoholsorral és desztillált vízzel rehidratáltuk, majd hővel történő epitóp feltárást végeztünk 6,0-s pH-jú citrát pufferrel (Hisztopatológia Kft, Pécs, Magyarország) és peroxidáztuk a mintákat (Hisztopatológia Kft, Pécs, Magyarország). A nem specifikus kötődéseket borjú szérum albumin (BSA) fehérjeoldattal (Hisztopatológia Kft, Pécs, Magyarország) gátoltuk. 1:1000-es hígításban elsődleges anti-fibronektin antitesttel (Abcam, Cambridge, Anglia) jelöltük a metszeteket. Ez a primer antitest egy nyúl poliklonális ellenanyag, ezért az alkalmazott másodlagos antitestként a peroxidázzal jelölt anti-nyúl egylépcsős polimer előhívót (Hisztopatológia Kft, Pécs, Magyarország) használtuk. Az előhívást a HISTOLS rezisztens amino-etilkarbazol (AEC) kromogén/szubsztrát rendszerrel végeztük el, majd a metszeteket hematoxin oldattal kontrasztfestettük. 400x-os nagyításon meghatároztuk a glomerulusok AEC pozitívan festődő barna területeinek arányát a teljes vizsgált területhez viszonyítva. *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) és *Scion Image* (Informer Technologies, In. Madrid, Spanyolország) szoftverekkel. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá.

3.4.4. Sirius-red festés

A Sirius-red festési eljárás a kollagén I, II és III[113]-at pirosan, a sejtmagot és a citoplazmát sárgán festi. A fibrotikus terület kvantifikálása érdekében minden állat veséjéről egyenként, 100x-os nagyítású területet jelöltünk ki. Az így annotált képeket exportáltuk. Az *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Incorporated San Jose, CA, USA) program segítségével kijelöltük a pirossal ábrázolódó fibrotikus szövetet, majd ugyanezen program használatával a kijelölt területet feketére, a fennmaradó részeket

fehérre alakítottuk át. A képek Sirius Red festéssel megjelölt, piros színű területeinek százalékos arányát ImageJ szoftverrel számítottuk ki. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá.

3.4.5. A vese immunfluoreszcens vizsgálata

A fagyasztott vesemetszeteket Shandon cryomatrixba ágyaztuk (Life Science Ltd., Budapest, Magyarország) majd kriosztáttal 10 µm vastag metszeteket készítettünk. A kiolvasztott metszeteket 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, nedveskamrában PBS-ben hígított (1:1000) α-SMA ellenes (ld. western blot) és (1:100) PDGFR-β ellenes elsődleges antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Ezt követően a metszeteket PBS-sel mostuk, majd másodlagos egér-ellenes Alexa Fluor 488 (1:100, Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) antitesttel vagy másodlagos nyúl-ellenes Alexa Fluor 568 (1:100, Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) antitesttel inkubáltuk és Hoechst 33342-vel (Life Technologies, Budapest, Magyarország) kontrasztfestettünk, hogy a sejtmagot láthatóvá tegyük. Az autofluoreszcencia elkerülése érdekében és a specifikusság alátámasztására festési kontrollokat használtunk, amely metszeteket nem inkubáltunk az elsődleges antitesttel. A metszeteket száradás után Vectashield Mounting Mediummal (Vector Labs., Biomarker Kft., Budapest, Magyarország) fixáltuk, fedőlemezrel fedtük, majd Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézermikroszkóppal (Zeiss, Jena, Németország) elemeztük 630x-as nagyítás alatt.

3.5. *In vitro* kísérletek

Kísérleteinkben immortalizált humán kidney 2 (HK-2) proximális tubulussejteket (LGC Standards, ATCC Cat# CRL-2190) használtunk. A HK-2 proximális tubulussejteket 5,5 mM glükózt tartalmazó DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tenyésztettük, melyekhez 10% FBS-t (Foetal bovine serum, GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin/sztreptomycin antibiotikum oldatot (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) és 1% L-glutamint adtunk. A sejteket 95%-os páratartalom mellett, 5% CO₂ tartalmú,

37°C-os termosztátba tenyésztettük. A kezelések előtt, 24 órára a sejteket 6 well-et tartalmazó lemezekre (5×10^5 sejt/well), szérummentes tápfolyadékba helyeztük.

A HK-2 kezelésekor a sejteket normál (5,5 mM), magas glükóz (35 mM) koncentrációjú, illetve ozmotikus kontrollként magas mannitol (5,5 mM glükóz + 29,5 mM mannitol) koncentrációjú tápfolyadékban tartottuk 24 órán át, így vizsgálva a hiperglikémia közvetlen hatását a proximális tubulusra. A magas glükóz koncentrációjú tápfolyadékban tartott sejteken 24 órán át a 4. táblázatban található adott dózisú RAAS-gátló kezelést alkalmaztunk. A kontroll sejteket DMSO vivőanyagban tartottuk (n=6 well/csoport).

4. táblázat: A HK-2 sejtek kezelés során alkalmazott glükóz, mannitol, és RAAS-gátló gyógyszerek koncentrációi

Kezelés típusa	Kezelési koncentráció
Glükóz (kontroll sejtek)	5,5 mM
Magas glükóz	35 mM
Magas mannitol	5,5 mM glükóz + 29,5 mM mannitol
Magas glükóz + Ramipril	35 mM + 10 μ M
Magas glükóz + Lozartán	35 mM + 10 μ M
Magas glükóz + Spironolakton	35 mM + 200 nM
Magas glükóz + Eplerenon	35 mM + 10 μ M

A letapadt sejteket a további vizsgálatokhoz 24 vagy 48 vagy 72 óra után 0,25% tripszin-EDTA oldattal (GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) felvettük, majd azokból fehérjét és RNS-t izoláltunk.

3.6. RNS-izolálás, cDNS szintézis, RT-PCR reakció

Az RNS izolálást Total RNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Thaiföld) gyártói protokoll szerint végeztük el.

350 μ l 1 % β -merkaptoetanol és RB-puffer elegyét mértünk minden mintára, majd 1 percre homogenizáltuk azokat. A mintákat Filter Column-ba pipettáztuk, amiket 2 ml-es

gyűjtőcsőbe helyeztünk, és lecentrifugáltuk (13 000 rpm, 30 sec). A felülúszóhoz 350 µl 70%-os etil-alkoholt adtunk, felszuszpendáltuk az oldatot, majd az elegyet az izoláló oszlopra pipettáztuk és centrifuga (13 000 rpm, 1 perc) segítségével elválasztottuk az RNS-t a minta egyéb összetevőitől. A szűrőn megtapadt RNS-t először 400 µl W1 pufferrel centrifugáltuk, majd 2x mostuk 600 µl Wash pufferrel. Az RNS eluációja 30 µl RNáz mentes vízzel történt steril Eppendorf-csővekbe.

A kinyert RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (BCM, Huston, TX, USA) állapítottuk meg, vakként RNáz mentes vizet használtunk. Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR reagensekkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a gyártó leírását követve 500 ng RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. Az RT-qPCR mérésekhez 18s riboszómális RNS, TGF- β , CTGF, MMP2, TIMP1 és PDGF génekre specifikus forward és reverse primereket terveztünk az NCBI nukleotid adatbázisban található szekvenciák alapján (5. táblázat). A PCR reakció lejátszódásához a reakcióelegy végtérfogatát 20 µl-re állítottuk be úgy, hogy 10 µl SYBR Green LightCycler 480 SYBR Green I Master enzim mixet (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország), 1 µl cDNS mintát, 7 µl nukleáz-mentes vizet és az adott célfehérjére specifikus 1-1 µl forward és reverse primert pipettáztunk össze. A méréseket LightCycler 480 készülékkel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) végeztük el és analizáltuk. Az egyes gének mRNS expressziójának arányát a 18s riboszómális RNS háztartási gén expressziójának mértékéhez hasonlítva határoztuk meg. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá.

5. táblázat: A reverz transzkripció polimeráz-lánreakció során használt gének és primereik

Gén neve	NCBI azonosító	Primer szekvencia		Termék hossz	T _a
<i>Tgfb1</i>	21803	Forward:	5'-GCA CCG GAG AGC CCT GGA TAC C-3'	222 bp	60 °C
		Reverse:	5'-CCC GGG TTG TGT TGG TTG TAG AGG-3'		
<i>Pdgfb</i>	24628	Forward:	5'-TCG ATC GCA CCA ATG CCA ACT TCC-3'	236 bp	62 °C
		Reverse:	5'-CAC GGG CCG AGG GGT CAC TAC TGT-3'		
<i>Ctgf</i>	64032	Forward:	5'-TCC ACC CGG GTT ACC AAT GAC AAT AC-3'	195 bp	58 °C

Gén neve	NCBI azonosító	Primer szekvencia		Termék hossz	T _a
		Reverse:	5'-CTT AGC CCG GTA GGT CTT CAC ACT GG-3'		
<i>Mmp2</i>	81686	Forward:	5'-TCC CCC AAA ACA GAC AAA GAG T-3'	224 bp	56 °C
		Reverse:	5'-TTG CGG GGA AAG AAG TTG TAG T-3'		
<i>Timp1</i>	116510	Forward:	5'-GGC GCC CTT TGC ATC TCT GG-3'	250 bp	58 °C
		Reverse:	5'-GGC GAA CCG GAA ACC TGT GG-3'		
<i>Rn18s</i>	100861533	Forward:	5'-GCG GTC GGC GTC CCC CAA CTT CTT-3'	105 bp	60 °C
		Reverse:	5'-GCG CGT GCA GCC CCG GAC ATC TA-3'		
<i>TGFBI</i>	7040	Forward:	5'-GCG TGC GGC AGC TGT ACA TTG ACT-3'	174 bp	60 °C
		Reverse:	5'-CGA AGG CGC CCG GGT TAT GC-3'		
<i>PDGFB</i>	5155	Forward:	5'-AGA TGG GGC CGA GTT GGA CCT GAA-3'	163 bp	62 °C
		Reverse:	5'-GCG CCG GGA GAT CTC GAA CAC CT-3'		
<i>CTGF</i>	1490	Forward:	5'-GTC CAC CCG GGT TAC CAA TGA CAA-3'	228 bp	58 °C
		Reverse:	5'-CAG GAT CGG CCG TCG GTA CAT ACT-3'		
<i>RN18S</i>	HQ387008.1	Forward:	5'-CGG GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG-3'	136 bp	60 °C
		Reverse:	5'-GCG GTG CTC CAT TTA TCA GA-3'		

3.7. Áramlási citometriás mérés

Első lépésben a HK-2 sejteket 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk/permeabilizáltuk (FACS Permeabilizing Solution 2, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ezt követően a sejteket szobahőmérsékleten specifikus elsődleges anti- α SMA (Sigma-Aldrich, Cat# A2547), valamint anti-PDGF-B antitesttel (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA) inkubáltuk 30 percen keresztül, 1:100-as hígításban. Permeabilizáló pufferrel történő mosással a nem kötődött antitesteket eltávolítottuk. A mosás után 30 percig szobahőmérsékleten fénytől elzárva inkubáltuk a sejteket az elsődleges antitestre specifikus, fluoreszcens festékkel konjugált, elsődleges anti- α SMA

esetén Alexa 488-konjugált csirke anti-egér, anti-PDGF-B antitest esetén Alexa 488-konjugált csirke anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal, 1:200-as hígításban. A negatív kontrollokat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. Majd permeabilizáló pufferrel történő mosással a nem kötődött másodlagos antitesteket eltávolítottuk, ezt követően PBS pufferben felvettük a sejteket. A mérést BD FACSAria™ áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. Az élő sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoltuk be. Minden kezelési csoportból 10.000 sejtet számoltunk le. Az eredményeket ezután BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szoftver segítségével értékeltük ki.

3.8. Fehérje izolálás, western-blot

A vese szövet vizsgálata esetén a vese cortexből szövetmintát vettünk, majd 4 °C-os, 7,4 pH-ra beállított lízis pufferben (6. táblázat) homogenizáltuk Fastprep RP120 homogenizátorral (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

6. táblázat: Lízis puffer összetétele

Hatóanyag	Koncentráció
Tris(hidroximetil)aminometán (Tris)	1 M
Etilénglikol-tetraecetsav (EGTA)	0,5 M
Triton X-100	1 %
Nátrium-fluorid (NaF)	0,25 M
Fenilmetánszulfonil-fluorid (PMSF)	0,5 M
Nátrium-ortovanadát (Na ₃ VO ₄)	0,5 M
Leupeptin	5 mg/ml
Aprotinin	1,7 mg/ml
Desztillált víz	10 ml-re kiegészítve

200 µl lízis puffert pipettáztunk minden egyes homogenizáló golyót tartalmazó Eppendorf oszlopba, majd behelyeztük a cortex darabot. Az eppendorf oszlopot 50 mozdulat/sec sebesség mellett 2 percig ráztuk. A ráztatás után 10 percen keresztül centrifugáltuk 4 °C-on, 13 000 rpm-en a homogenizátumot.

A felülúszóból Bio Rad Protein Assay Kit-tel (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA) megmértük a fehérjék koncentrációját. BSA (bovine serum albumin) törzsoldatból hígítási sort készítettünk (0,5 mg/ml; 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml és 5 mg/ml BSA). A 10x-esére hígított fehérje mintákat és a reagenseket gyártói protokoll alapján 96 lyukú ELISA plate well-jeibe összemértük. Minden mintából 3 párhuzamos mérést végeztünk.

Az abszorbanciát spektrofotometriás módszerrel (Chameleon V Florometer-Luminometer Photom, Hidex, Turku, Finnország) 690 nm-en detektáltuk. A BSA hígítási sorhoz tartozó átlagos abszorbancia értékek alapján felállított kalibrációs egyenes segítségével kiszámoltuk a minták összfehérje koncentrációját.

A fehérjelizátumokat 95 °C-on, 5 percig, 4x-es Laemmli pufferben (7. táblázat) denaturáltuk.

7. táblázat: Laemmli puffer összetétele

Hatóanyag	Koncentráció
TRIS-HCl (pH=6,7)	12,5 mM
Nátrium dodecil szulfát (SDS)	4%
Merkaptoetanol	4%
Glicerol	15%
Brómfenolkék	0,01%

Ezt követően 4-20 %-os Mini-PROTEAN TGX poliakrilamid gélen (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA) gélelektroforézissel szétválasztottuk a fehérjéket (200 V, 40 perc, szobahőmérséklet). A gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA). A blotolást követően a membránt 1% Ponceau S (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) és 25 % ecetsav (Reanal Kft, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékben inkubáltuk 3 percig, hogy ellenőrizzük a fehérjeátvitel sikerességét. A membránt lefotóztuk, a kiértékelés során elvégzett összfehérje mennyiség korrigálása végett. A festék lemosása után a membránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül inkubáltuk blokkoló oldatban (1% TBS és 5% zsírmentes tejpor). Blokkolás után a membránt egy éjszakán keresztül, 4 °C-on a specifikus elsődleges anti- α SMA (Sigma-Aldrich, Cat# A2547) ellenanyaggal 1:2000

hígításban inkubáltuk. Másnap TBS-0,05% Tween20-al mostuk a membránokat. Mosást követően a membránokat az elsődleges antitestre specifikus torna-peroxidáz enzimmel konjugált goat anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology, Cat# 7076) másodlagos antitesttel, 1:6000 hígításban TBS-0,05% és Tween20-at tartalmazó oldatban inkubáltuk 1 óráig, szobahőmérsékleten. Az 1 óra elteltével a felesleges, be nem kötött ellenanyagot további mosásokkal (3x10 perc) távolítottuk el.

Az előhívást Versa Doc készüléken végeztük (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA) kemilumineszcens módszerrel, ECL plus reagens (GE Healthcare Life Sciences, Budapest, Magyarország) hozzáadásával. A jelet denzitometriás módszerrel, Versadoc Quantity One szoftverrel (Bio-Rad, Budapest, Magyarország) értékeltük ki. A normalizált optikai denzitás értékeket a háttér kivonása után, a Ponceau festésre kapott összfehérje eredményekre és belső kontrollra korrigálva kaptuk meg. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá.

3.9. Statisztikai kiértékelés

Az adatok kiértékelését Graphad statisztikai szoftverrel végeztük. Első lépésben normalitástesztet végeztünk Kolmogorov és/vagy D'Agostino módszerrel, majd ha az adatok a tesztek alapján normális eloszlást mutattak, akkor One-Way ANOVA (Analysis of variance) és Bonferroni Post Test-et használtunk. Amennyiben nem normális eloszlású volt az adatsor Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az eredményeket átlag \pm SEM vagy medián és 5-95 percentilisben adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *In vivo* eredmények

4.1.1. DKD kialakulása T1DM állatmodellben

4.1.1.1. RAAS-gátlók non depresszor hatásának igazolása

A RAAS inhibitorok dózisait korábbi kísérleteink és irodalmi adatok alapján [111, 114-118] úgy választottuk meg, hogy antihipertenzív hatásuktól függetlenül fejtsék ki renoprotektív hatásukat, gátolva a RAAS megfelelő elemeinek expresszióját, illetve aktivitását.

8. táblázat: Kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok vérnyomás értékei a két hetes kezelési periódus végén . Kontroll (K), diabéteszes (D), illetve enalaprilal (ENA), ramiprilal (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) és eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatok vérnyomás értékei átlag \pm SEM-ben megjelenítve (n=6-8).

Paraméterek	Kontroll	Diabétesz (D)	D+ ENA	D+ RAM	D+ LOZ	D+ SPI	D+ EPL
Artériás középnyomás (Hgmm)	70,0 \pm 3,15	69,4 \pm 5,93	66,2 \pm 2,33	72,3 \pm 2,79	70,3 \pm 7,65	77,4 \pm 8,16	72,3 \pm 5,48
Pulzus (BPM)	380 \pm 8,30	387 \pm 10,9	355 \pm 19,7	362 \pm 8,76	371 \pm 6,13	346 \pm 15,8	333 \pm 6,75

A két hetes kezelési periódus végére a vérnyomás nem változott egyik csoportban sem, ami igazolja a megfelelő, non-depresszor dózisos kiválasztását (8. táblázat).

4.1.1.2. RAAS-gátlók hatása a metabolikus paraméterekre T1DM állatmodellben

Hét héttel az STZ-indukált diabétesz kialakulása után a cukorbetegségekre jellemző kóros metabolikus laborparamétereket mértünk, melyet a 9. táblázat összegez.

A diabéteszes csoportban a megemelkedett szérumban glükóz- és fruktózamin igazolja a DM hosszútávú fennállását. Emellett megfigyelhető a diabéteszes állatoknál a testsúlynövekedésének elmaradása, valamint a magasabb koleszterin és triglicerid szintek, melyek a lipídanyagcsere zavarára utalnak. A RAAS-gátlók közül a lozartán, spironolakton és eplerenon szignifikánsan javította a koleszterin szintjét.

9. táblázat: Kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok metabolikus laborparaméterei. A Kontroll (K), diabéteszes (D), illetve enalaprilal (ENA), ramiprilrel (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) és eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatok metabolikus paraméterei átlag ± SEM-ben megjelenítve. HDL-magas denzitású lipoprotein. n = 7-8/csoport. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Kontroll, §§§p<0,001 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz

Paraméterek	K	D	D+ ENA	D+ RAM	D+ LOZ	D+ SPI	D+ EPL
Testtömeg (g)	418 ± 8,23	267 ± 11,4 ***	291 ± 13,3 ***	265 ± 7,68 ***	258 ± 12,8 ***	245 ± 16,2 ***	288 ± 12,5 ***
Súlynövekedés (Δg)	223 ± 11,5	66,4 ± 11,0 ***	90,0 ± 15,7 ***	70,0 ± 7,07 ***	71,4 ± 11,0 ***	79,7 ± 11,5 ***	95,5 ± 12,1 ***
Szérumban glükóz (mmol/l)	12,7 ± 0,59	47,3 ± 3,98 ***	35,3 ± 3,23 *	44,1 ± 1,57 *	43,8 ± 2,45 *	42,6 ± 2,00 *	34,8 ± 2,45 *
Fruktózamin (μmol/l)	153 ± 2,09	243 ± 6,86 ***	250 ± 5,09 **	249 ± 5,10 *	256 ± 7,45 *	239 ± 5,87 *	239 ± 6,85 *
Koleszterin (mmol/l)	1,69 ± 0,04	2,35 ± 0,05 **	1,80 ± 0,12	2,21 ± 0,10	1,54 ± 0,05 §§§	1,66 ± 0,11 §§	1,88 ± 0,08
HDL-Koleszterin (mmol/l)	2,21 ± 0,10	1,55 ± 0,18 *	1,77 ± 0,20	1,83 ± 0,07	1,87 ± 0,07	1,29 ± 0,13 ***	1,32 ± 0,08 ***
Triglicerid (mmol/l)	0,42 ± 0,03	1,90 ± 0,50 **	1,49 ± 0,45	0,98 ± 0,34	1,31 ± 0,37	1,37 ± 0,20 *	1,51 ± 0,33 *

4.1.1.3. RAAS-gátlók javították a veseműködést T1DM állatmodellben

A vizsgálat végére a diabéteszes állatokban a DKD-ra jellemző funkcionális károsodások jelentkeztek: megemelkedett a vese/testtömeg arány és a szérumban kreatinin, karbamid szint, fokozódott a glükózürítés és a mikroalbuminúria, valamint csökkent a kreatinin-clearance. A RAAS-gátlók csökkentették a vese hipertrófiát, és a glükóz ürítést, valamint javították az urea nitrogén és kreatinin clearance paramétereket, igazolva renoprotektív hatásukat. Továbbá a RAAS-gátlók közül a lozartán, a spironolakton és az eplerenon tendenciálisan csökkentette a mikroalbuminúria mértékét (10. táblázat).

10. táblázat: Renális laborparaméterek kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban. A Kontroll (K), diabéteszes (D), illetve enalaprilal (ENA), ramiprilal (RAM), lozartánnal (LOZ), spironolaktonnal (SPI) és eplerenonnal (EPL) kezelt diabéteszes állatok metabolikus paraméterei átlag \pm SEM-ben megjelenítve. DN: detektálhatatlan. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; N=7-8/csoport.

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

4.1.2. A RAAS-gátlók mérsékeltek a DKD-ra jellemző strukturális és fibrotikus elváltozásokat T1DM állatmodellben

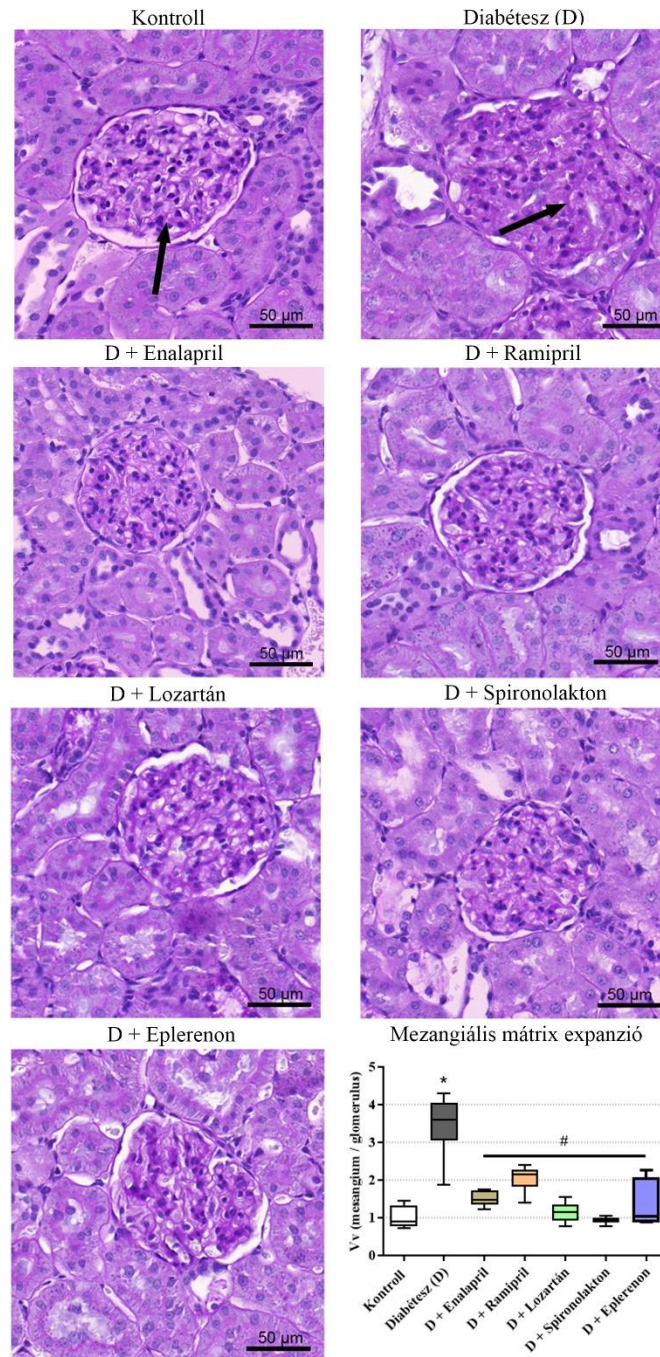
A vesében, a DKD-ra jellemző extracelluláris mátrix expanzió mértékét PAS festett metszeteken vizsgáltuk. A PAS festés az extracelluláris mátrix szövetét püspöklilára festi. A kontroll állatok veséjében egészséges vesestruktúrát figyeltünk meg, míg a DM-ben a kapilláris lumenek beszűkültek és a glomerulusok belsejében az extracelluláris mátrix mennyisége megemelkedett. A RAAS-gátlók jelentősen csökkentették az extracelluláris mátrix felhalmozódását (8. ábra).

A vese fibrózis folyamata kiemelt jelentőséggel bír a DKD progressziójában. A fibrózis során felszaporodó kollagénben dús kötőszöveti lerakódást Masson-féle Trichrome eljárással vizsgáltuk meg. Az eljárás során a sejtplazma és a vörösvértestek vörösre, a sejtmagok feketére, míg a kollagén kék színűre festődik. A diabéteszes állatok veséjében az intersticiumban jelen lévő kollagénben dús kötőszöveti lerakódás szignifikáns mértékben felszaporodott a kontroll állatok egészséges veseszövetéhez képest. A RAAS-gátló kezelések csökkentették a kötőszöveti lerakódások mennyiségét (9. ábra).

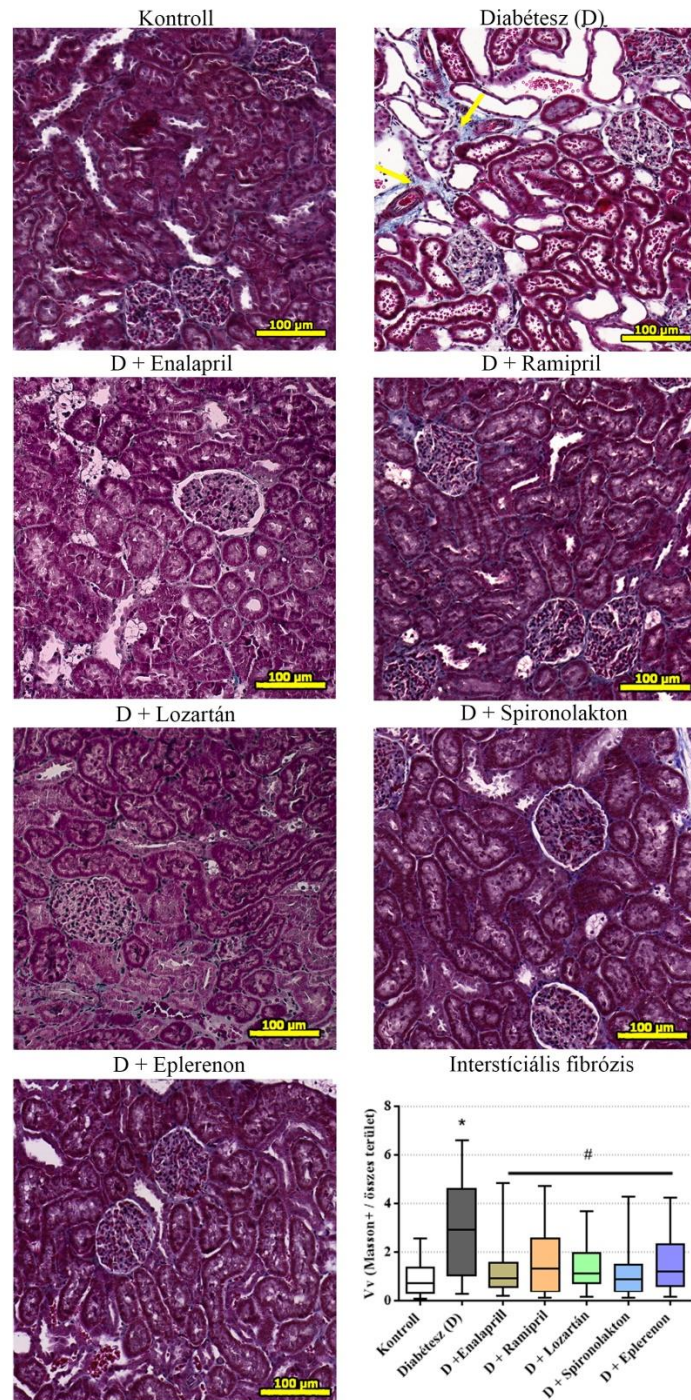
Az ECM-ben jelen lévő kollagén felszaporodását a Masson-féle Trichome festési eljárással párhuzamosan Sirius-red festéssel is vizsgáltuk. A Masson festéssel ellentétben (ami egy univerzális kollagén populációt fest) a Sirius-red festési eljárás specifikusan a kollagén I-et és kollagén III-at festi meg pirosra, a sejtmagot és a citoplazmát pedig sárgára. A kezeletlen diabéteszes állatok veséjében megemelkedett kollagén mennyiségét a RAAS- gátlók jelentősen csökkentették (*10. ábra*).

Fibrózis során felszaporodik az extracelluláris mátrix, melynek fő komponensei a kollagén és a fibronectin. Nagyfokú fibronectin festődést detektáltunk a diabéteszes állatok glomerulusaiban. Emellett kisebb mennyiségben a tubulointersticiális régióban is kimutatható volt a fibronectin. A RAAS-gátlók - az enalapril kivételével - a fibronectin felszaporodást szignifikánsan csökkentették, azaz anti-fibrotikus hatásúnak bizonyultak (*11. ábra*).

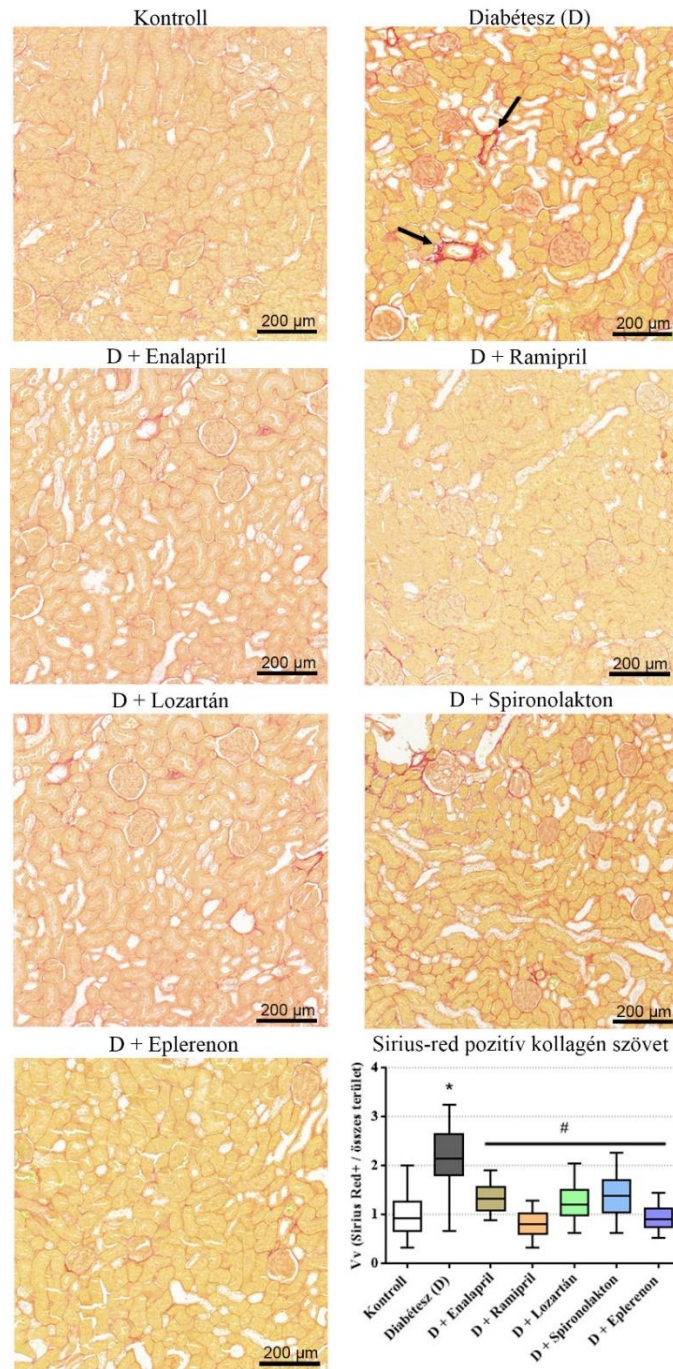
A RAAS-gátlók között nem észleltünk különbséget a mezangiális mátrix expanzió és kollagén vizsgálat (Masson-féle Trichome és Sirius-red eljárással) során, azonban az aldosteron antagonistáknak jelentősebb volt a fibronectin szintézist gátló hatásuk.



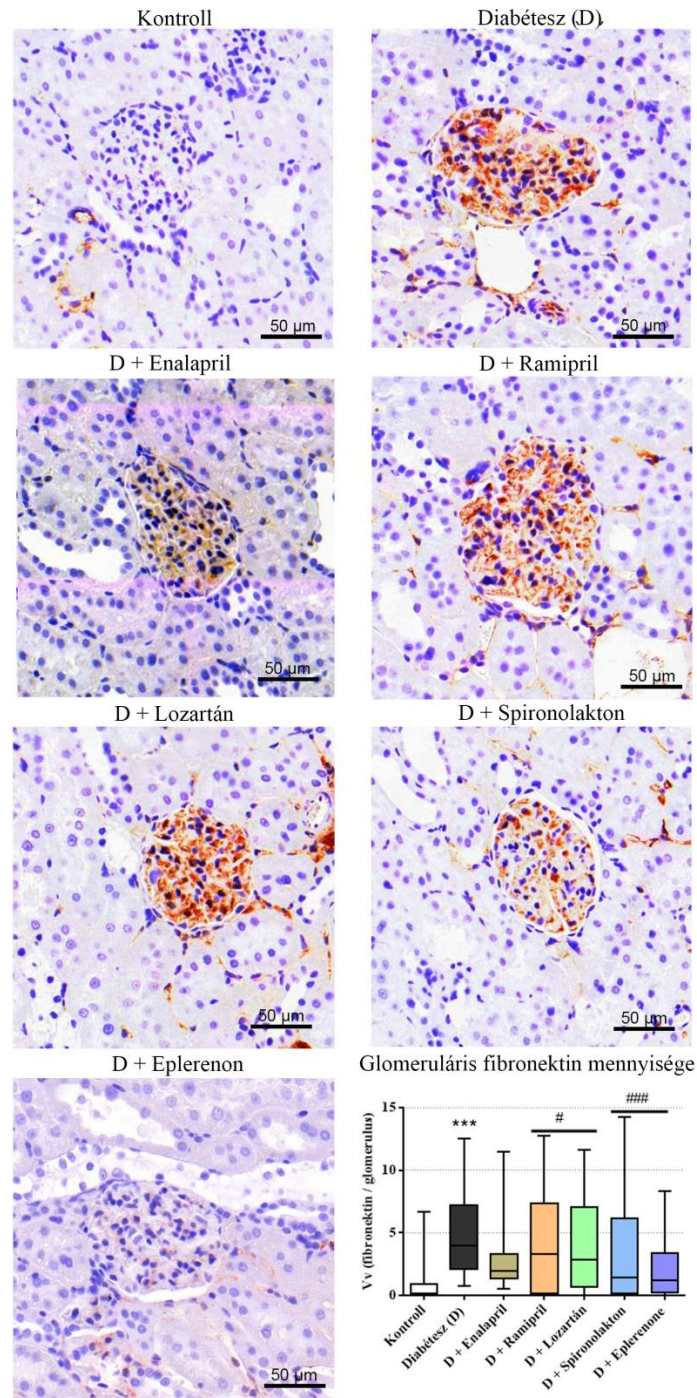
9. ábra: Mezangiális mátrix szövet kiterjedése kontroll, kezeltlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben. A kontroll, diabéteszes, illetve enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal és eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok perjódsvav-Schiff festett vese metszetek reprezentatív képei (400x nagyítás; lépték 50 µm). A mezangiális mátrix expanszió (Vv) mértékét a mezangiális mátrix/glomerulus terület arányával határoztuk meg. A fekete nyilak a püspöklila festődésű mezangiális mátrixot jelölik a glomerulusokban. Az adatokat medián és 5-95 percentilisben ábrázoltuk. *p<0,05 vs. Kontroll; #p<0,05 vs. D; N=7-8/csoport.



10. ábra: Kollagénben dús kötőszöveti lerakódás kiterjedése kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben. A kontroll, diabéteszes, illetve enalaprillal, ramiprillal, lozartánnal, spironolaktonnal és eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok Masson-féle Trichome festett vese metszetek reprezentatív képei (200x nagyítás; lépték 100 μ m). Az intersticiális fibrózis (Vv) mértékét a masson pozitív szövet / összes terület arányával határoztuk meg. A sárga nyilak jelölik a kötőszöveti lerakódásokat az intersticiumban. Az adatokat medián és 5-95 percentilisben ábrázoltuk. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; N=7-8/csoport.



11. ábra: Kollagén szövet kiterjedése kontroll, kezeltlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben. A kontroll, diabéteszes, illetve enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal és eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok Sirius-red festett vese metszetek reprezentatív képei (100x nagyítás; lépték 100 µm). A kollagén szövet kiterjedésének (Vv) mértékét a Sirius-red pozitív szövet / összes terület arányával határoztuk meg. A fekete nyilak jelölik a kollagén szövetet. Az adatokat medián és 5-95 percentilisen ábrázoltuk. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; N=7-8/csoport.

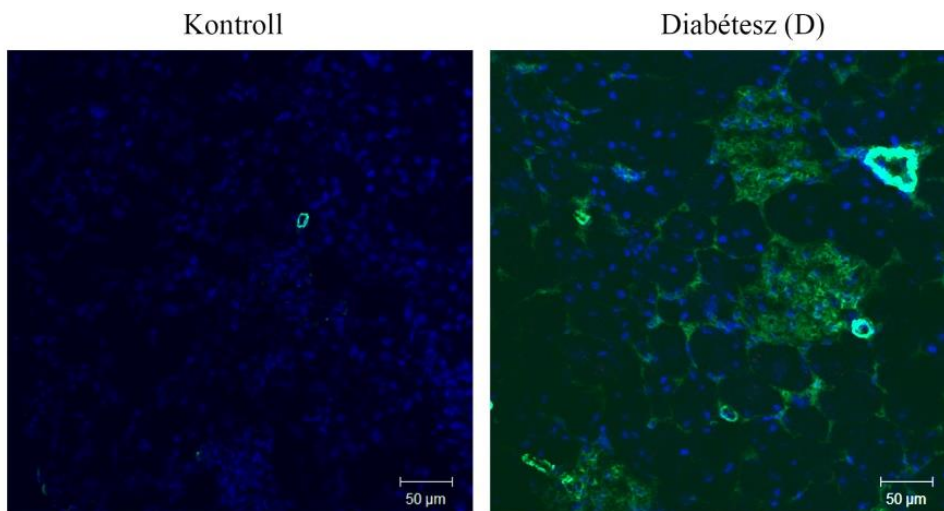


12. ábra: Fibronektin kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben. A kontroll, diabéteszes, illetve enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal és eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok fibronektin festett vese metszetek reprezentatív képei (400x nagyítás; lépték 50 μ m). A fibronektin kiterjedésének (Vv) mértékét a fibronektin pozitív szövet / glomerulus terület arányával határoztuk meg. A reprezentatív metszeteken a fibronektin barna színnel festődik. Az adatokat medián és 5-95 percentilisen ábrázoltuk. *** $p < 0,001$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; ### $p < 0,001$ vs. D; N=7-8/csoport.

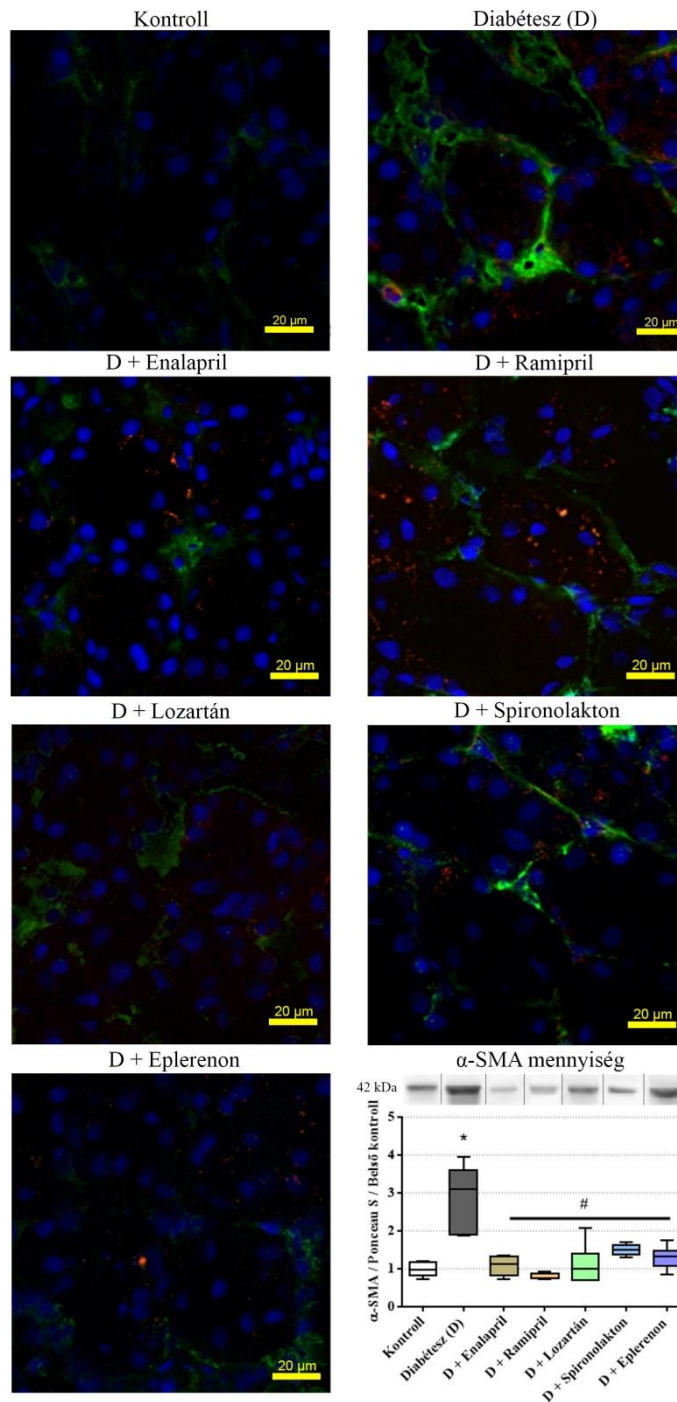
4.1.3. A RAAS-gátlók csökkentették az α -simaizom aktin (α -SMA) mennyiségét az T1DM állatmodellben

DKD-ban a veseszövet fibrotikus átalakulása során a fibroblaszt sejtek *de novo*, nagy mennyiségű α -SMA-t expresszálnak és miofibroblasztokká differenciálódnak[79]. A miofibroblasztok expanziója ECM felhalmozódáshoz vezet, ami a fibrózis egyik jellegzetessége. A leggyakrabban alkalmazott miofibroblaszt marker az α -SMA[81]. Immunhisztokémiai módszerekkel megvizsgáltuk a renális α -SMA lokalizációját, ezzel párhuzamosan a vese szövetből fehérjét izoláltunk és western blot metodika segítségével mértük a fehérje mennyiségét a kezeletlen és a RAAS-gátlóval kezelt diabéteszes állatokban.

A reprezentatív immunfluoreszcens képeken az α -SMA zöld, a sejtmagok kék színnel jelölődnek (12. ábra). A kontroll állatok veséjében az α -SMA (zöld szín) intenzitása gyenge, ezzel ellentétben a kezeletlen diabéteszes állatok vesemetszetein az α -SMA intenzitása megemelkedik az intersticiális térben. Az intenzitást minden egyes RAAS-gátló kezelés csökkentette, az intenzitás erősségét nem kvantifikáltuk, a konfokális mikroszkóp összetett beállításából adódóan. Az immunfluoreszcens eredményeket azonban western blottal végzett vizsgálattal megerősítettük: igazoltuk, hogy a diabéteszes állatok veséiben α -SMA mennyisége szignifikánsan megemelkedett az egészséges kontroll állatokhoz képest, és az összes RAAS-gátló kezelés mérsékelte az emelkedést (13. ábra). Az immunfluoreszcens képeken a piros szín a tubulus sejtek belsejében elhelyezkedő PDGF- β receptort jelöli.



13. ábra: α -SMA lokalizációja kontroll és kezelt diabéteszes állatok veséiben. A kontroll és diabéteszes állatok α -SMA antitesttel festett vese metszetek reprezentatív képei (200x nagyítás; lépték 50 μ m). Az α -SMA zöld színnel jelenik meg, a kék szín a sejtmagok Hoechst-festődését jelzi.



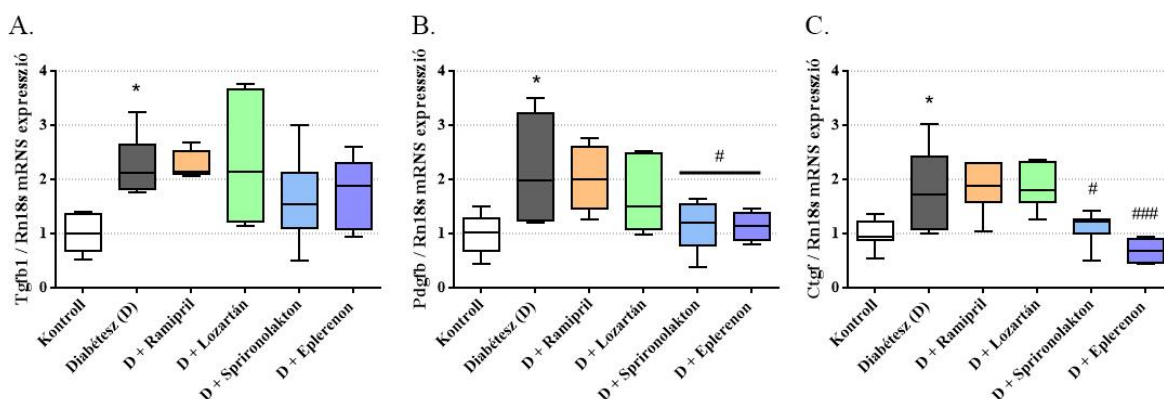
14. ábra: α -SMA lokalizációja és mennyisége, PDGF- β lokalizációja kontroll, kezelt diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok veséiben. A kontroll, diabéteszes, illetve enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal és

eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok α -SMA és PDGF- β antitesttel festett vese metszetek reprezentatív képei (630x nagyítás; lépték 20 μ m). Az α -SMA zöld, a PDGF- β piros színnel jelenik meg. A kék szín a sejtmagok Hoechst-festődését jelzi. Az α -SMA mennyégi meghatározását western blot technikával végeztük el. Az adatokat medián és 5-95 percentilisben ábrázoltuk. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; N=7-8/csoport.

4.1.4. A RAAS-gátlók mérsékelték a fibrózis indukálta növekedési faktorok mennyiségét T1DM állatmodellben

A növekedési faktoroknak - úgymint TGF β , PDGF és CTGF-nek- kulcsfontosságú szerepe van a DKD indukálta vesefibrózis patomechanizmusában.

Valós idejű reverz transzkripció polimeráz-lánreakció segítségével megvizsgáltuk a kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok TGF β , PDGF és CTGF expresszióját. Vizsgálataink megerősítették, hogy mindhárom növekedési faktor mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedik a diabéteszes állatok veséiben. A RAAS kezelés a TGF β mRNS expressziót nem befolyásolta, a PDGF és CTGF expressziót az aldoszteron antagonisták szignifikánsan csökkentették (14. ábra).

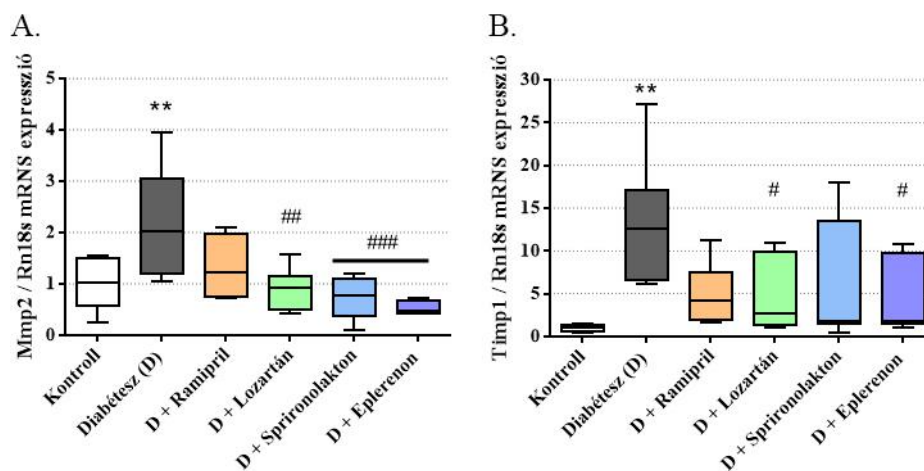


15. ábra: TGF β , PDGF és CTGF mRNS expresszió kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban. A grafikonok a TGF β (A.), PDGF (B.) és CTGF (C.) mRNS expresszióját ábrázolják, kontroll, diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban. Az értékeket medián és 5-95 percentilisben ábrázoltuk. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; ### $p < 0,001$ vs. D; N=7-8/csoport.

4.1.5. A RAAS-gátlók mérsékelték a mátrix metalloproteináz 2 és szöveti inhibitorának (TIMP1) mennyiségét az T1DM állatmodellben

A vesében található ECM proteinek lebontását és felépítését az MMP-k és inhibitoraik a TIMP-ek szabályozzák[119]. Vizsgálatainkban a gelatináz típusú MMP2 és az MMP2 inhibitorának, a TIMP1-nek az mRNA expresszióját vizsgáltuk.

Mind az MMP2 mind a TIMP1 mRNA expressziója megemelkedett a diabéteszes állatok veséjében. A RAAS-gátlók, a ramipril kivételével, csökkentették az MMP2 mRNA expressziót,. Az aldosteron antagonisták MMP2 expresszió gátló hatása erősebb, mint az angiotenzin II receptor blokkoló lozartáné. A TIMP1 mRNA expresszióját a lozartán és eplerenon csökkentette szignifikáns mértékben (15 ábra).

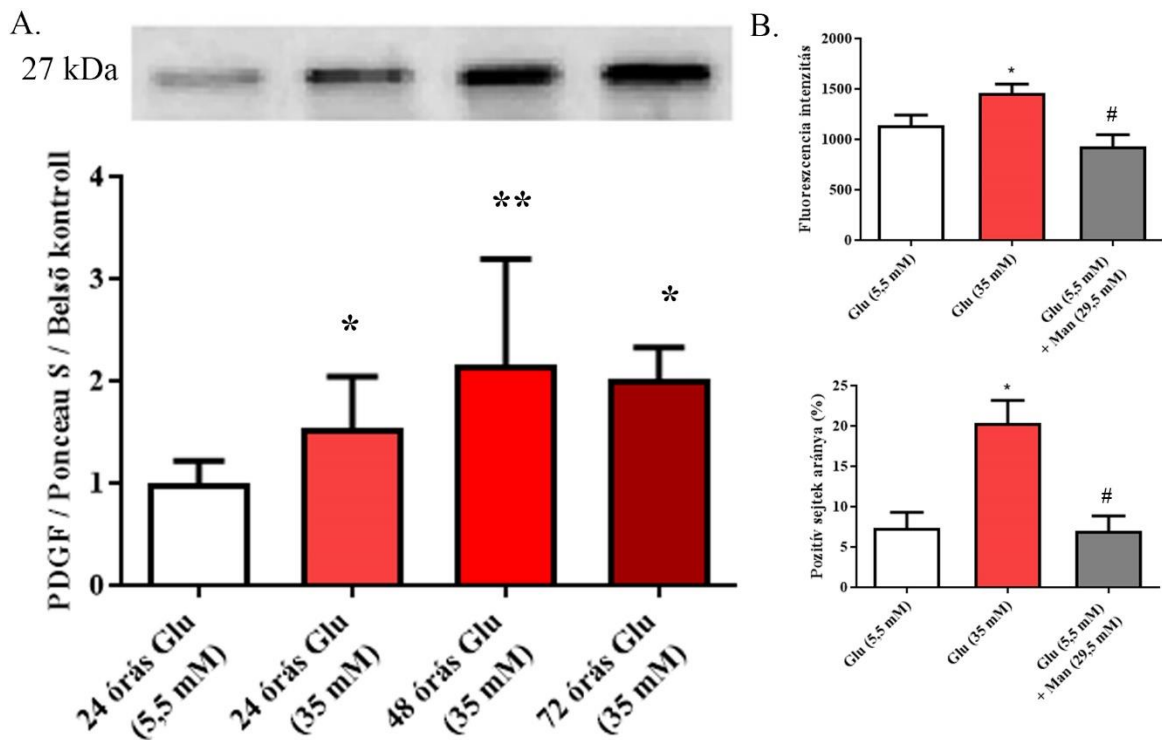


16. ábra: MMP2 és TIMP1 mRNA expresszió kontroll, kezeletlen és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban: A grafikonok a MMP2 (A.) és TIMP1 (B.) mRNA expresszióját ábrázolja, kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatokban. Az értékeket medián és 5-95 percentilisben ábrázoltuk. ** $p < 0,005$ vs. Kontroll; # $p < 0,05$ vs. D; ## $p < 0,005$ vs. D; ### $p < 0,001$ vs. D; N=7-8/csoport.

4.2. *In vitro* eredmények

4.2.1. Magas glükóz hatására a proximális tubulus sejtekben megemelkedett a PDGF fehérje mennyisége

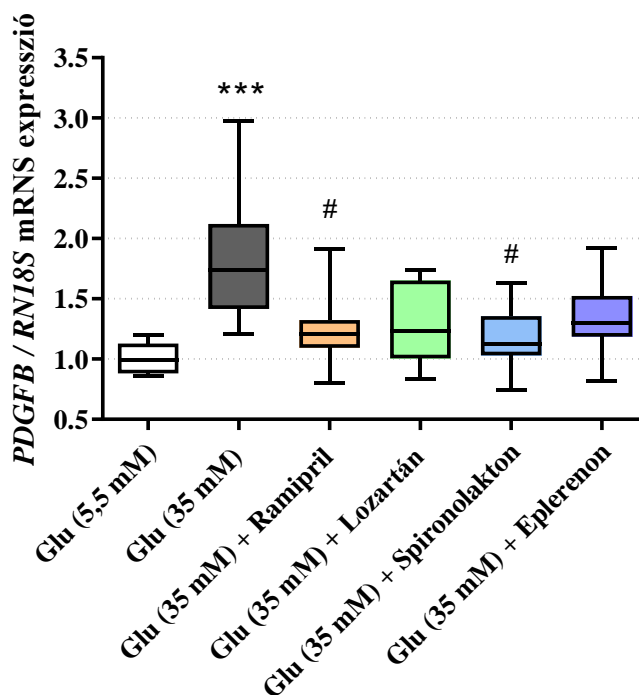
A növekedési faktorok közül a PDGF-nek kitüntetett szerepe van a DM-indukálta vesefibrosisban. A PDGF receptorral rendelkező mezenhimális sejtek (fibroblasztok, vaszkuláris simaizomsejtek) PDGF hatására aktiválódnak és sejtproliferációs jelátviteli útvonalakat indítanak be[120], melyek hozzájárulnak a fibrotikus folyamatok progressziójához. Humán proximális tubulus (HK-2) sejtekben *in vitro* vizsgáltuk a PDGF fehérje mennyiségét, normál (5,5 mM) és magas (35 mM) glükóz koncentrációjú kezelések után. A PDGF fehérje mennyisége 24 óra után szignifikánsan megemelkedett a magas (35 mM) glükóz koncentrációjú kezelés hatására, ezért a további vizsgálatokhoz 24 órás kezelést alkalmaztunk (16. ábra). Áramlási citométeres vizsgálattal kimutattuk, hogy a magas (35 mM) glükóz koncentrációval kezelt sejtekben a PDGF fehérje mennyisége szignifikánsan magasabb volt, a normál kontroll csoporthoz viszonyítva (5,5 mM glükóz). A 35 mM izoozmotikus mannitol kezelt és a kontroll csoport PDGF fehérje mennyisége között nem volt különbség (16. ábra), mely igazolja a direkt glükóz hatást.



17. ábra: PDGF fehérje mennyisége 35 mM glükóz kezelést követően a proximális tubulus sejtekben. A. 24, 48, 72 órás 35mM koncentrációjú glükózkezelés hatására a proximális tubulus sejtekben a PDGF fehérje mennyisége megemelkedik. B. A PDGF fehérje 24 órás 35 mM koncentrációjú glükóz kezelés hatására szignifikánsan megemelkedik, a mannitol kezelés hatására azonban nem változik a kontroll csoporthoz (5,5 mM glükóz) képest. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. * $p < 0,05$ vs. Kontroll (Glu 5,5 mM); ** $p < 0,005$ vs. Kontroll (Glu 5,5 mM); # $p < 0,05$ vs. Glu (35 mM); N=3-6/csoport.

4.2.2. A RAAS-gátlók csökkentették a PDGF fehérje mennyiségét a proximális tubulussejtekben

A 24 órás magas glükóz (35 mM) kezelést követően megemelkedett a PDGF mRNS expressziója HK-2 sejtekben. Ezt az emelkedést a ramipril és a spironolakton szignifikánsan, a lozartán és az eplerenon pedig tendenciálisan csökkentette (17. ábra).



18. ábra: PDGF mRNS expresszió 24 órás 35nM glükóz és RAAS-gátló kezelést követően a proximális tubulus sejtekben. HK-2 sejtekben a 24 órás magas glükóz kezelés megemeli a PDGF fehérjeszintet és ezt az emelkedést a RAAS-gátlók különböző mértékben csökkentik. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. *** $p < 0,001$ vs. Glu (5,5 mM); # $p < 0,05$ vs. Glu (35 mM); N=5-6 / csoport.

5. MEGBESZÉLÉS

A DKD a végstádiumú veseelégtelenség vezető oka, melynek előfordulási gyakorisága folyamatosan növekszik világszerte. Súlyosságát jelzi, hogy a kardiovaszkuláris morbiditás számottevően magasabb a DKD-ban szenvedő betegek esetében, mint az egészséges populációban[121]. A DKD progressziója során megfigyelhető a vese hemodinamikájának felborulása, endotél diszfunkció, strukturális (fibrotikus) elváltozások a glomerulusban, tubulusban és/vagy interstíciumban.

Jelenleg a különböző terápiák csak lassítják a DKD progresszióját, hatékony kezelési megoldás nem létezik[122]. Ismert, hogy a DM-ben fokozódik a RAAS aktivitása mind szisztémásan, mind a vesében lokálisan, melynek jelentős szerepe van a vesefibrózis kialakulásában[123, 124]. A folyamatos RAAS aktiváció következtében a vese arteriolák összehúzódnak, a külső és belső ellenállás megemelkedik, melynek következtében a glomerulusok belsejében fokozódik a kapilláris nyomás. A megemelkedett nyomás következtében proteinurea és oxidatív stressz alakul ki[42]. A folyamat többek között endoteliális diszfunkcióhoz és a mezangiális sejtek proliferációjához vezet, melynek következtében proinflammatorikus jelátviteli útvonalak és profibrotikus folyamatok aktiválódnak[44]. A RAAS gátlása csökkenti a vérnyomást és a proteinureát, megelőzi a vese fibrózis kialakulását és lassítja a renális funkciók romlását[52]. A RAAS-gátlókat a RAAS kaszkádban kifejtett hatásuk szerint négy osztályba soroljuk: direkt renin inhibitorok, ACE gátlók, ARB-k és aldosteron antagonisták. A direkt renin inhibitorok a RAAS kaszkád első lépésébe avatkoznak be, megakadályozva a renin átalakulását angiotenzin I-é. Az ACE gátlók megakadályozzák az angiotenzin I átalakulását angiotenzin II-vé, emellett csökkentik az aldosteron szekréciót. Az ARB-k a RAAS kaszkád utolsó lépésében gátolják az angiotenzin receptor aktivációját, így mérséklék az AngII hatását. Mind az ACE gátlók, mind az ARB-k az efferens artéria nyomásának csökkentése révén enyhítik az intraglomeruláris nyomást[123]. A klinikai gyakorlatban elsődlegesen ACE gátlót vagy ARB-t alkalmaznak a mikroalbuminúria megjelenésekor. Azonban az úgynevezett aldosteron szökés jelensége miatt előfordulhat, hogy sem az ACE gátló sem az ARB használata nem elég hatékony a proteinúria csökkentéséhez. Az aldosteron szökés során, máig tisztázatlan módon[125], az AngII-től függetlenül is

termelődik aldosteron, amely proinflammatorikus és profibrotikus jelátviteli utakat aktivál, tubulointersticiális fibrózist és glomeruloszklerózist indukál, fokozva a DKD progresszióját[126]. Az aldosteron szökés jelensége az ACE gátlóval vagy ARB-val kezelt betegek 20-40%-ában alakul ki, és ilyen esetekben aldosteron antagonisták használata javasolt[127]. Az aldosteron antagonisták monoterápiában való alkalmazása jelenleg nem szerepel az ajánlásokban, azonban egyre több klinikai vizsgálat igazolja, hogy monoterápiás használatuk javítja a DKD progresszióját[128-130]. Blánaid M. Hicks és mtsai által végzett tanulmány tovább erősíti az aldosteron antagonisták monoterápiás alkalmazásának a lehetőségét, ugyanis egy kohorsz vizsgálatban kimutatták, hogy a több, mint 5 éve tartó ACE gátló kezelésekben részesült betegek esetében nagyobb volt a tüdőrák előfordulási gyakorisága[131]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a rutinszerűen alkalmazott ACE-gátlók, ARB-k, illetve a spironolakton mellett, a kevesebb mellékhatással járó eplerenon is ugyanolyan hatékonyan javítja a vese strukturális és funkcionális károsodását a DKD során[111].

Az aldosteron antagonistá spironolakton szerkezete nagymértékben hasonlít a progeszteronéhoz, így a mineralokortikoid receptor mellett az androgén és progeszteron receptorhoz is kötődik. Ennek következtében férfiakban libidó csökkenést és ginekomasztíát, premenopauzális korban lévő nőknél menstruációs zavarokat okozhat[132, 133]. Ez a mellékhatásprofil korlátozza a spironolakton alkalmazhatóságát, használata fokozott körültekintést igényel. A szintén aldosteron antagonista eplerenon szelektíven képes bekötődni a mineralokortikoid receptorhoz. Az eplerenonnak 20-szor kisebb az affinitása a mineralokortikoid receptorhoz, mint a spironolaktonnak, viszont az aldosteron blokkolás 50%-ához fele annyi dózis elegendő, mint a spironolakton esetében[134]. Ennek ellenére az eplerenon törzskönyvezése a DNP terápiájában még nem történt meg.

Makhlough A. és mtsai egy kettős vak randomizált klinikai vizsgálatban kimutatták, hogy a monoterápiában alkalmazott spironolakton kezelés ugyanolyan hatékony, mint a kombinációs spironolakton, lozartán kezelés[135]. Jing Hou és mtsai tanulmányukban kifejtették, hogy az aldosteron hatásának gátlása hozzájárulhat a proteinurea csökkentéséhez a DKD progressziójának lassításához[134]. Továbbá az aldosteron antagonisták

eredményesek a DKD-t kísérő endovaszkuláris komplikációk megelőzésében is[133], melyek előfordulása DKD-ban 15-20-szor gyakoribb[136].

Az utóbbi években számos új terápiás lehetőséget írtak le, melyek lassítják a DKD progresszióját, azonban a betegség összetettsége okán egyik terápiás lehetőség sem tökéletes, így munkánk témája ezen terápia további vizsgálata. Kutatásunk a hiperglikémia által kiváltott vesefibrózis vizsgálatára és a RAAS-gátlók újfajta antifibrotikus hatásmechanizmusára irányul. Munkánk során igazoltuk, hogy T1DM-ben a RAAS-gátlók – az aldosteron antagonistákkal együtt – a vérnyomás csökkentése nélkül hatékonyan mérsékelik a DM-ben megjelenő fibrotikus folyamatok progresszióját. Kísérleteink során a RAAS-gátlók dózisát úgy választottuk meg, hogy ACE, angiotenzin receptor és aldosteron inhibitor funkciójukat ellássák, azonban a vérnyomást ne befolyásolják. Ezáltal vizsgálni tudtuk a szerek vérnyomástól független antifibrotikus hatását, amely vizsgálatokat az irodalom eddig nem tárgyalt.

A DKD során a fokozódó hiperglikémia, hiperfiltráció, glomeruláris hipertrófia és ezzel együtt járó GFR csökkenés következtében a vesében egyre súlyosbodó hisztopatológiai elváltozások figyelhetőek meg. A hisztológiai elváltozások legmarkánsabb jegye a mezangiális szövet felszaporodása, ami a betegség kialakulásától számított 5-7 évben figyelhető meg[27]. Mavrakanas és munkatársai vizsgálataiban STZ indukálta diabéteszes patkánymodellben a 8 hetes ramipril kezelés csökkentette a proteinuriát, és a mezangiális mátrix expansió mértékét [137]. Sang-Youb Han és munkatársai leírták, hogy a spironolakton kezelés csökkentette a vizeletbe való albumin kiválasztást és a glomeruloszklerózis mértékét T2DM patkánymodellben[138]. Szintén T2DM állatmodellben az eplerenon és enalapril mérsékelte a kollagén IV expressziót, csökkentette a vizeletbe való albumin kiválasztás és glomeruloszklerózis mértékét[139]. Ezek az irodalmi adatok megerősítik vizsgálataink eredményét, miszerint diabéteszes állatmodellben az összes RAAS-gátló használata csökkenti a mezangiális mátrix expansió mértékét. A mezangiális mátrix expansióval párhuzamosan a citoskeleton remodelling és a miofibroblaszt differenciáció által α SMA keletkezik. STZ indukálta diabéteszes vesebeteg patkánymodellben emelkedett α SMA expressziót mutattak ki, emellett pozitív korrelációt figyeltek meg az α SMA pozitív sejtek száma és a glomeruláris mezangiális expansió illetve az intersticiális fibrózis között[140]. Kísérleteinkben a

diabéteszes vesében található α SMA mennyisége szignifikánsan megemelkedett a kezeletlen kontroll csoportéhoz képest és minden egyes RAAS-gátló kezelés csökkentette ezt az emelkedést. Immunfluoreszcens módszerrel vizsgálva az egészséges állatok veséiben csak az erek körül található α SMA, azonban DM hatására a fibrotikus vesében a tubulusok közötti intersticiális térben is megjelenik. Ramipril kezelése hatására az α SMA génexpresszió csökkenését figyelték meg De Blasio és mtsai STZ diabéteszes patkánymodellben[141]. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta az α SMA mennyiségének csökkenését és lokalizációjának változását a különböző RAAS-kezelések következtében.

A renális fibrózis patomechanizmusa során a fibronektinnek kitüntetett szerepe van az ECM összetett hálózatának kialakításában. A Nerlich és mtsai 31 különböző stádiumú diabéteszes vesebetegét vizsgálva azt találták, hogy a megnövekedett mezangiális mátrixban a fibronektin mennyisége is megemelkedett[142]. Hasonló megfigyelést tettek 10 diabéteszes beteg immunfestett vesebiopsziáin Makino H. és mtsai is[143]. Yuan Qiao és mtsai STZ-indukálta diabéteszes patkánymodellben a fibronektin mennyiségének emelkedését figyelték meg[144]. Az irodalommal összhangban, vizsgálatainkban a fibronektin mennyisége a diabéteszes állatok glomerulusaiban megemelkedett, mely emelkedést az enalapril kivételével, az összes RAAS-gátló kezelés mérsékelte. Az aldoszteron antagonisták hatékonyabbnak bizonyultak a fibronektin mennyiségi növekedésének mérséklésében. Wyczalkowska-Tomasik A.[145] és mtsai STZ indukált diabéteszes patkánymodellben hasonló megfigyelést tettek: enalapril kezelés hatására nem, spironolakton kezelés hatására viszont a fibronektin mennyiség csökkenését figyelték meg immunhisztokémiás módszerrel. Fontos különbség azonban, hogy a vizsgálataik során a losartán kezelés -valószínűsíthetően a nagy szórással rendelkező értékek miatt - nem csökkentette a fibronektin mennyiségét.

Az ECM komponensek lebontása és felépülése természetes fiziológiás körülmények között egy egyensúlyi folyamat, ahol a lebontást az MMP fehérjecsalád mediálja. Az MMP2 egy olyan endopeptidáz, ami az ECM főbb fehérjekomponenseinek degradációjáért felelős. Az MMP fehérjecsaládot a TIMP-ek szabályozzák, azok gátlásán keresztül[71]. Ni és mtsai STZ indukálta diabéteszes patkánymodellben kimutatták, hogy a TIMP1 expressziója megemelkedik[146]. Emellett TIMP1 expresszió emelkedését figyelték meg Jinyang és mtsai T2DM egérmodellben is[147]. Takamiya és mtsai

munkája alapján STZ-indukálta diabéteszes egérmodellben az MMP2 expresszió megemelkedik a diabétesz korai szakaszában[141]. A renális MMP2 expresszió egy kompenzatorikus folyamat az STZ indukálta DKD-ban[148]. Az általunk végzett vizsgálatok is ezeket az eredményeket támasztják alá: kísérleteinkben az MMP2 és a TIMP1 expressziója szignifikánsan megemelkedett a diabéteszes állatokban. A lozartán és aldosteron antagonisták az MMP2 expresszió mértékét szignifikáns módon mérsékeltek és ennek az expresszióknak a csökkentésében az aldosteron antagonisták hatékonyabbnak bizonyultak. A TIMP1 expressziót ugyanolyan mértékben mérsékelte a lozartán és az eplerenon kezelés. Az irodalomban a mi kutatócsoportunk vizsgálta elsőként a DKD során a TIMP1, MMP2 mRNS expresszió változását különböző RAAS-kezelések hatására[149].

A mezangiális szövet felszaporodásával egyidőben profibrotikus jelátviteli útvonalak aktiválódnak, melynek következtében számos növekedési faktor (TGF β , CTGF, PDGF) mennyisége megemelkedik. A TGF β expressziója diabéteszes patkánymodellben[150] és egérmodellben is szignifikánsan megemelkedik[151]. A CTGF túltermelődése központi szerepet játszik a vesefibrózisban[152], expressziója szignifikáns mértékben megemelkedik STZ indukálta diabéteszes Wistar patkánymodellben[153], C57BL/6J egérmodellben[154]. A RAAS-gátlók közül, a spironolakton T2DM patkánymodellben csökkenti a CTGF expressziót[138]. A PDGF a glomerulusban, elsődlegesen a mezangiális és epitel sejtekben volt megfigyelhető. Transzgenetikus egér modellben H. Suzuki és mtsai megfigyelték[155], hogy a PDGF- β jelátviteli útvonal aktiválódása a megnövekedett oxidatív stressz és a felszaporodó mezangiális mátrix által hozzájárul a diabéteszes vesebetegség progressziójához. Goro Uehara és mtsai humán vese biopsziákon kimutatták[102], hogy a PDGF expresszió magasabb a diabéteszes kórállapotban, mint egészséges vesében. Az irodalmi adatok megerősítik vizsgálataink eredményét, miszerint a CTGF és PDGF expresszió diabéteszes vesekárosodás esetén megemelkedik[156-158] és az aldosteron antagonisták eredményesen csökkentik a CTGF[159] expresszióját. Az mRNS expresszió csökkenése valószínűsíthetően a mineralokortikoid receptor aktivitás (mely a kollagén termelést befolyásolhatja[160]) csökkentése révén valósulhat meg. Ezt a feltételezést megerősíti, a csökkent kollagén degradáció, vagyis a korábban tárgyalt MMP2 mennyisége hasonlóan csökken az aldosteron antagonisták kezelés hatására. Diabéteszben a TGF β expressziója megemelkedik[150], viszont vizsgálatainkban a TGF β

expresszió szintje a RAAS kezelések hatására nem változott. Ennek oka valószínűsíthetően a különböző állatmodellek és kísérleti kondíciók alkalmazása: YS Kang és mtsai T2DM patlánymodellben (úgynevezett „Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty„ patkányokon) mutattak ki eplerenon és enalapril kezelés hatására TGF β expresszó csökkenést[139]. RE Gilbert és mtsai a TGF β expresszió csökkenését STZ (50 mg/ttkg) kezelt 24 hetes diabéteszes patkánymodellel mutatták ki ramipril (1 mg/ttkg) kezelés hatására. Vizsgálataikban a ketoacidózis elkerülése érdekében és a testtömeg csökkenés minimalizálására a diabéteszes állatok hosszú hatástartalmú inzulint (4 Egység/nap) kaptak[161]. M Lian és mtsai 4 hetes eplerenon kezelés (~100 mg/ttkg/nap) hatására STZ kezelt (55 mg/kg) spontán hipertenzív patkányon észleltek TGF β fehérje csökkenést. Hasonlóan Gilbert és mtsai vizsgálataihoz, a diabéteszes állatok itt is kaptak inzulin kezelést (2 Egység/nap)[162]. Összességében, a jelenség pontos megértéséhez további vizsgálatokra van szükség.

Mivel a PDGF a diabéteszes vesekárosodás patomechanizmusában kulcsfontosságú szerepet tölt be, és a vesekárosodás hatására az epitel sejtekbe expresszállódik[120], ezért *in vivo* vizsgálataink mellett, *in vitro* is megvizsgáltuk, hogy a korábban tárgyalt PDGF fehérjék mennyisége hogyan változik a vese proximális tubulus sejteiben hiperglikémia hatására. A vese tubulus rendszere a proximális tubulussal kezdődik, ahol a filtrált Na⁺ 70 %-a szívódik vissza, a glükóz teljes mértékben és a bikarbonát 90%-ban reabszorbalódik. Magas glükóz hatására a proximális tubulussejtekben megemelkedett a PDGF fehérje mennyisége, azonban mannitol kezelés hatására ez az emelkedés nem volt megfigyelhető. Ebből arra következtethetünk, hogy PDGF mennyiségi emelkedés a glükóz direkt hatása miatt következett be, hiszen az izoozmotikus mannitol nem változtatta meg a PDGF mennyiségét. Vizsgálatainkban a ramipril és spironolakton kezelés mérsékelte a glükóz hatására megemelkedett PDGF mRNS expressziót a proximális tubulus sejtekben. A PDGF mRNS expresszió csökkenése tendenciálisan a többi RAAS-gátló kezelés esetében is megfigyelhető. Azonban a szignifikancia szintet ezek a mennyiségi változások nem érik el, feltehetően a nem megfelelően megválasztott kezelési dózis következtében.

Feltételezésünk szerint a proximális tubulussejtek által termelt PDGF[163] mennyisége hiperglikémiás környezetben megemelkedik és részben ennek

következményeként fibrotikus jelátviteli útvonalak aktiválódnak, továbbá a renális fibrózis egyik legjellemzőbb markerének, az α -SMA fehérjének az expressziója fokozódik.

A Ph.D. munkám során vizsgáltuk, hogy a DKD patomechanizmusában hogyan befolyásolják a RAAS-gátló kezelések a fibrózis progresszióját. Hisztológiai módszerek segítségével tanulmányoztuk a strukturális és fibrotikus elváltozásokat, vizsgáltuk a renális fibrózis markereinek kvantitatív változásait, az α -SMA fehérje lokalizációját, a fibrózis indukálta növekedési faktorok expressziójának emelkedését illetve csökkenését. Emellett *in vitro* megfigyeltük a PDGF fehérje és mRNA mennyiségi változását hiperglikémia, illetve a különböző RAAS-gátló kezelések hatására.

Igazoltuk, hogy a monoterápiában alkalmazott RAAS inhibitorok hatékonyak a DKD által kiváltott vesekárosodás csökkentésében és a fibrotikus folyamatok mérséklésében [149]. A diabéteszes vese funkcionális és strukturális paraméterei javultak, emellett a fibrotikus elváltozások is mérséklődtek. Azonban a RAAS inhibitorok antifibrotikus hatásának, pontos jelátviteli útvonalainak feltérképezésére, valamint a kezelések előnyeinek és hátrányainak megértésére (különös tekintettel az aldosteron antagonisták esetében) további kísérletek mellett jól kontrollált humán klinikai vizsgálatokra is szükség van.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Igazoltuk, hogy a DKD experimentális modelljében a RAAS-gátlók monoterápiás alkalmazásban javítják a vese funkcionális paramétereit; mérséklik a strukturális és fibrotikus szöveti elváltozásokat.
2. Kísérletsorozatunkban elsőként mutattuk ki, hogy a RAAS-gátlók közül az aldosteron antagonisták, azon belül az eplerenon monoterápiás alkalmazása a legalkalmasabb - a fibronectin szintézist gátolva és a PDGF, CTGF expressziót csökkentve – a vesefibrózis progressziójának lassítására, a metabolikus paraméterek javítása mellett.
3. Kimutattuk, hogy az aldosteron antagonisták (spironolakton és eplerenon) hatékonyabban csökkentik a profibrotikus faktor PDGF és CTGF expresszióját , mint az ACE-gátlók vagy ARB-k a DKD experimentális állatmodelljében. A TGF expresszió azonban az általunk alkalmazott kísérleti modellben nem változott a RAAS-gátló kezelések hatására.
4. *In vitro* vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a RAAS-gátlók csökkentik a hiperglikémia által megnövekedett PDGF termelését a proximális tubulussejtekben, ami hozzájárulhat az antifibrotikus hatásukhoz.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Diabétesz mellitusz (DM) napjaink egyik legnagyobb népegészségügyi problémája, melynek pontos patomechanizmusa nem ismert, azonban azt tudjuk, hogy kialakulása kulcsfontosságú szereppel bír a diabéteszes vesebetegség (DKD) megjelenésében. A DKD a felnőttkori krónikus veseelégtelenség vezető oka, jelenleg terápiájára nincs hatékony gyógyszeres kezelés. A jelenlegi ajánlások szerint az angiotenzin konvertáz gátlók (ACE-gátlók) vagy az angiotenzin receptor blokkolók (ARB) az elsődlegesen választandó terápiás szerek. Ezek a kezelések ugyan lassíthatják a DKD progresszióját, azonban a betegek többsége így is dialízisre vagy vesetranszplantációra szorul.

Ph.D. munkám bemutatja a DKD patomechanizmusát, kiemelve a fibrózis kulcsfontosságú szerepét. Értekezésem tárgyalja a RAAS-gátlók renoprotektív és antifibrotikus hatásának háttérében álló lehetséges patomechanizmusokat, valamint a DKD során kialakuló fibrózis mechanizmusában részt vevő profibrotikus faktorok jelentőségét, különös tekintettel a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) központi szerepére.

Enalaprillal, Ramiprillel, Lozartánnal, Spironolaktonnal és Eplerenonnal kezelt streptozotocin indukált diabéteszes patkánymodellben vizsgáltuk a veseelégtelenség mértékét és a RAAS-gátlók protektív hatását. A hiperglikémia direkt hatását - a PDGF jelátviteli útvonal pontosabb megértése céljából - *in vitro* körülmények között is vizsgáltuk.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a monoterápiában alkalmazott RAAS inhibitorok hatékonyak a DKD által kiváltott vesekárosodás mérséklésében[149]. Elsőként igazoltuk, hogy az aldoszteron antagonisták bírnak a legjobb antifibrotikus hatással, melyben jelentős szerepe van a proximális s tubulusok által termelt profibrotikus faktorok mennyiségi (főként a PDGF) csökkenésének.

Mindezek alapján azt reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak a DKD során kialakuló vesefibrózis jobb megértéséhez és segíthetik a hatékonyabb megelőzési és kezelési stratégiák kidolgozását, valamint új terápiás lehetőségeket nyithatnak a már törzskönyvezett gyógyszerek számára.

8. SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is one of the biggest public health issues of our time. The exact pathomechanism of DM is not known, however we know, that its development has a key role in the occurrence of Diabetic Kidney Disease (DKD). DKD is the leading cause of adult chronic kidney disease, there is currently no effective medication for its' treatment. According to current recommendations, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACE inhibitors) or angiotensin receptor blockers (ARBs) are the first-choice therapeutic drugs. Although these medications can slow the progression of DKD, the majority of patients still require dialysis or kidney transplant.

My Ph.D. study presents the pathomechanism of DKD, highlighting the key role of fibrosis. My dissertation discusses the possible pathomechanism behind the renoprotective and antifibrotic effect of RAAS-inhibitors and the importance of the profibrotic factors in the DKD induced fibrotic mechanism, especially the central role of platelet-derived growth factor (PDGF).

We studied the rate of kidney failure and the protective effect of RAAS-inhibitors in streptozotocin induced diabetic rat model treated with Enalapril, Ramipril, Losartan, Spironolactone and Eplerenon. For the better understanding of the PDGF signaling pathway, we also examined the direct effect of hyperglycemia in *in vitro* conditions.

Our experiments showed, that RAAS-inhibitors used in monotherapy are effective in mitigating the DKD induced kidney damage. We were the first ones to prove, that aldosterone antagonists have the best antifibrotic effect, in which the quantitative decrease of profibrotic factors (mostly PDGF) produced by the proximal tubule has a significant role.

Based on above, we hope our results contribute to a better understanding of DKD induced kidney fibrosis and can help in developing more efficient prevention and treatment strategies, as well as opening the door to new therapeutic options for already registered medications.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. IDF Diabetes Atlas, *7th edn.* 2015. International Diabetes Federation, 2019., p. 4.
2. Jermendy, G., et al., *Prevalence rate of diabetes mellitus and impaired fasting glycemia in Hungary: cross-sectional study on nationally representative sample of people aged 20-69 years.* Croat Med J, 2010. **51**(2): p. 151-6.
3. Jermendy, G., et al., *Decreasing incidence of pharmacologically treated Type 2 diabetes in Hungary from 2001 to 2016: A nationwide cohort study.* Diabetes Res Clin Pract, 2019. **155**: p. 107788.
4. Kaló Zoltán dr., J.G.d., Winkler Gábor dr., Hidvégi Tibor dr., Borsi András, Novákné Pékli Márta dr., Kincses János, Kalotai Zoltán dr., Vokó Zoltán dr., *A cukorbetegség társadalmi terhe és egészségügyi prioritásának indoka.* Diabetologia Hungarica 2011. **XIX évfolyam**(3. szám).
5. Tulassay, Z., *A belgyógyászat alapjai 2.* Medicina Könyvkiadó Zrt. 2011. 4. fejezet - Anyagcsere-betegségek (regi.tankonyvtar.hu; azonososító: 978 963 226 300 7; források: www.medicina-kiado.hu; letöltés dátuma: 2021.03.18.)
6. Zendjabil, M., *Biological diagnosis of diabetes mellitus.* Pathol Biol (Paris), 2015. 64(1), p. 49-52.
7. Gaál Zs, G.L., Hidvégi T, Jermendy Gy, Kempler P, Winkler G, *Egészségügyi szakmai irányelv - A diabetes mellitus kórismezéséről, a cukorbeteg antihyperglykaemiás kezeléséről és gondozásáról felnőttkorban.* Diabetologia Hungarica, 2017. **25**(1): p. 3-77.
8. Gaál Zs, G.L., Hidvégi T, Jermendy Gy, Kempler P, Lengyel Cs, Várkonyi T, *Egészségügyi szakmai irányelv a diabetes mellitus kórismezéséről, a cukorbeteg antihyperglykaemiás kezeléséről és gondozásáról felnőttkorban.* diabetologia Hungarica, 2020. **28**(3): p. 119-204.
9. Wittmann, I., *Diabéteszes nephropathia.* Diabetológiai jegyzet orvostanhallgatók számára. Pécsi Tudományegyetem, 2014., p. 16-19.
10. Alicic, R.Z., M.T. Rooney, and K.R. Tuttle, *Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities.* Clin J Am Soc Nephrol, 2017. **12**(12): p. 2032-2045.

11. Saran, R., et al., *US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2017. **69**(3 Suppl 1): p. A7-a8.
12. Reutens, A.T., *Epidemiology of diabetic kidney disease*. Med Clin North Am, 2013. **97**(1): p. 1-18.
13. Wittmann, I., *Diabéteszes nephropathia*. Diabetológiai jegyzet orvostanhallgatók számára. Pécsi Tudományegyetem, 2014., p. 85-92.
14. Reidy, K., et al., *Molecular mechanisms of diabetic kidney disease*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2333-40.
15. Lim, A., *Diabetic nephropathy - complications and treatment*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 361-81.
16. Thomas, M.C., et al., *Diabetic kidney disease*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15018.
17. Rossing PFP, F.-R.B., Parving HH, *Diabetic nephropathy*. In: *Brenner and Rector's The Kidney, 10th Ed.* p. 1283–1381.
18. Fioretto, P., M.L. Caramori, and M. Mauer, *The kidney in diabetes: dynamic pathways of injury and repair. The Camillo Golgi Lecture 2007*. Diabetologia, 2008. **51**(8): p. 1347-55.
19. Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, *The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy*. Diabetes, 1983. **32 Suppl 2**: p. 64-78.
20. Kanasaki, K., G. Taduri, and D. Koya, *Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 7.
21. Solis-Herrera, C., C.L. Triplitt, and J.L. Lynch, *Nephropathy in youth and young adults with type 2 diabetes*. Curr Diab Rep, 2014. **14**(2): p. 456.
22. Tervaert, T.W., et al., *Pathologic classification of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 556-63.
23. Fioretto, P. and M. Mauer, *Histopathology of diabetic nephropathy*. Semin Nephrol, 2007. **27**(2): p. 195-207.
24. Brito, P.L., et al., *Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus*. Kidney Int, 1998. **53**(3): p. 754-61.

25. Marshall, C.B., *Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic?* Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(5): p. F831-f843.
26. Mason, R.M. and N.A. Wahab, *Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1358-73.
27. Mauer, S.M., et al., *Structural-functional relationships in diabetic nephropathy.* J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1143-55.
28. Najafian, B., et al., *Glomerulotubular junction abnormalities are associated with proteinuria in type 1 diabetes.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4 Suppl 2): p. S53-60.
29. Caramori, M.L., et al., *Cellular basis of diabetic nephropathy: 1. Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type 1 diabetes.* Diabetes, 2002. **51**(2): p. 506-13.
30. Lecompte, P.M., *The Kimmelstiel-Wilson lesion.* Diabetes, 1958. **7**(6): p. 495-6.
31. Ponchiardi, C., M. Mauer, and B. Najafian, *Temporal profile of diabetic nephropathy pathologic changes.* Curr Diab Rep, 2013. **13**(4): p. 592-9.
32. White, K.E., et al., *Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria.* Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3083-9.
33. Kaiser, N., et al., *Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells.* Diabetes, 1993. **42**(1): p. 80-9.
34. Susic, D., et al., *Collagen cross-link breakers: a beginning of a new era in the treatment of cardiovascular changes associated with aging, diabetes, and hypertension.* Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2004. **4**(1): p. 97-101.
35. Lubec, G. and A. Pollak, *Reduced susceptibility of nonenzymatically glucosylated glomerular basement membrane to proteases: is thickening of diabetic glomerular basement membranes due to reduced proteolytic degradation?* Ren Physiol, 1980. **3**(1-6): p. 4-8.
36. Turgut, F. and W.K. Bolton, *Potential new therapeutic agents for diabetic kidney disease.* Am J Kidney Dis, 2010. **55**(5): p. 928-40.

37. Penfold, S.A., et al., *Circulating high-molecular-weight RAGE ligands activate pathways implicated in the development of diabetic nephropathy*. *Kidney Int*, 2010. **78**(3): p. 287-95.
38. Tanji, N., et al., *Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(9): p. 1656-66.
39. Goldin, A., et al., *Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury*. *Circulation*, 2006. **114**(6): p. 597-605.
40. Heilig, C., et al., *Immunogold localization of high-affinity glucose transporter isoforms in normal rat kidney*. *Lab Invest*, 1995. **73**(5): p. 674-84.
41. Rudberg, S., et al., *Influence of insertion/deletion polymorphism in the ACE-I gene on the progression of diabetic glomerulopathy in type 1 diabetic patients with microalbuminuria*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(4): p. 544-8.
42. Giacchetti, G., et al., *The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(3): p. 120-6.
43. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(1): p. 16-20.
44. Siragy, H.M. and R.M. Carey, *Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease*. *Am J Nephrol*, 2010. **31**(6): p. 541-50.
45. Atlas, S.A., *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition*. *J Manag Care Pharm*, 2007. **13**(8 Suppl B): p. 9-20.
46. Roscioni, S.S., H.J. Heerspink, and D. de Zeeuw, *The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy*. *Nat Rev Nephrol*, 2014. **10**(2): p. 77-87.
47. Chawla, T., D. Sharma, and A. Singh, *Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy*. *World J Diabetes*, 2010. **1**(5): p. 141-5.
48. Ruster, C. and G. Wolf, *Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(7): p. 1189-99.

49. Campbell, K.N., L. Raij, and P. Mundel, *Role of angiotensin II in the development of nephropathy and podocytopathy of diabetes*. *Curr Diabetes Rev*, 2011. **7**(1): p. 3-7.
50. Higuchi, S., et al., *Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology*. *Clin Sci (Lond)*, 2007. **112**(8): p. 417-28.
51. Siragy, H.M. and R.M. Carey, *Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model*. *Hypertension*, 1999. **33**(5): p. 1237-42.
52. Lewis, E.J., et al., *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy*. *The Collaborative Study Group*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(20): p. 1456-62.
53. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(12): p. 861-9.
54. Lewis, E.J., et al., *Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(12): p. 851-60.
55. Estacio, R.O., et al., *Effect of intensive blood pressure control with valsartan on urinary albumin excretion in normotensive patients with type 2 diabetes*. *Am J Hypertens*, 2006. **19**(12): p. 1241-8.
56. de Boer, I.H., et al., *Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(25): p. 2366-76.
57. Retnakaran, R., et al., *Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74*. *Diabetes*, 2006. **55**(6): p. 1832-9.
58. Nathan, D.M., et al., *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(14): p. 977-86.
59. Patel, A., et al., *Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(24): p. 2560-72.
60. Andresdottir, G., et al., *Improved survival and renal prognosis of patients with type 2 diabetes and nephropathy with improved control of risk factors*. *Diabetes Care*, 2014. **37**(6): p. 1660-7.

61. Andresdottir, G., et al., *Improved prognosis of diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. *Kidney Int*, 2015. **87**(2): p. 417-26.
62. John, S., *Complication in diabetic nephropathy*. *Diabetes Metab Syndr*, 2016. **10**(4): p. 247-249.
63. Rachmani, R., et al., *The effect of spironolactone, cilazapril and their combination on albuminuria in patients with hypertension and diabetic nephropathy is independent of blood pressure reduction: a randomized controlled study*. *Diabet Med*, 2004. **21**(5): p. 471-5.
64. Cicoira, M., et al., *Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **37**(7): p. 1808-12.
65. Praga, M., *Therapeutic measures in proteinuric nephropathy*. *Kidney Int Suppl*, 2005(99): p. S137-41.
66. G., N., *International Conference on Harmonisation (ICH)*. In: *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*. Springer, 2009.
67. Fried, L.F., et al., *Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(20): p. 1892-903.
68. Pinzani, M., *Welcome to fibrogenesis & tissue repair*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2008. **1**(1): p. 1.
69. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 199-210.
70. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 524-9.
71. Kolset, S.O., F.P. Reinholt, and T. Jenssen, *Diabetic nephropathy and extracellular matrix*. *J Histochem Cytochem*, 2012. **60**(12): p. 976-86.
72. Karihaloo, A., *Anti-fibrosis therapy and diabetic nephropathy*. *Curr Diab Rep*, 2012. **12**(4): p. 414-22.
73. Meran, S. and R. Steadman, *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. *Int J Exp Pathol*, 2011. **92**(3): p. 158-67.
74. Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(12): p. 684-96.

75. Genovese, F., et al., *The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis?* Fibrogenesis Tissue Repair, 2014. **7**(1): p. 4.
76. Genovese, F., et al., *Turnover of type III collagen reflects disease severity and is associated with progression and microinflammation in patients with IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2016. **31**(3): p. 472-9.
77. Sand, J.M., et al., *MMP mediated degradation of type IV collagen alpha 1 and alpha 3 chains reflects basement membrane remodeling in experimental and clinical fibrosis--validation of two novel biomarker assays.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84934.
78. Boor, P. and J. Floege, *Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. **38**(7): p. 441-50.
79. Hinz, B. and G. Gabbiani, *Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts.* Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(5): p. 538-46.
80. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease.* Am J Physiol, 1999. **277**(1): p. C1-9.
81. Hinz, B., *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 526-37.
82. Schwarzbauer, J.E. and D.W. DeSimone, *Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
83. Eddy, A.A., *Molecular insights into renal interstitial fibrosis.* J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(12): p. 2495-508.
84. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.* Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
85. Penn, J.W., A.O. Grobbelaar, and K.J. Rolfe, *The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review.* Int J Burns Trauma, 2012. **2**(1): p. 18-28.
86. Meng, X.M., et al., *TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis.* Front Physiol, 2015. **6**: p. 82.
87. Meng, X.M., A.C. Chung, and H.Y. Lan, *Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases.* Clin Sci (Lond), 2013. **124**(4): p. 243-54.

88. Kunisaki, M., et al., *Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels*. Diabetes, 1994. **43**(11): p. 1372-7.
89. Ha, H., M.R. Yu, and H.B. Lee, *High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 463-70.
90. Yamagishi, S., et al., *Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(8): p. 952-9.
91. Ramana, K.V., *ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme*. Biomol Concepts, 2011. **2**(1-2): p. 103-114.
92. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *TGF-beta: the master regulator of fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(6): p. 325-38.
93. Garud, M.S. and Y.A. Kulkarni, *Hyperglycemia to nephropathy via transforming growth factor beta*. Curr Diabetes Rev, 2014. **10**(3): p. 182-9.
94. Dhawan, J. and S.R. Farmer, *Induction of collagen synthesis in response to adhesion and TGF beta is dependent on the actin-containing cytoskeleton*. Adv Exp Med Biol, 1994. **358**: p. 159-68.
95. Hocevar, B.A. and P.H. Howe, *Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components*. Methods Mol Biol, 2000. **142**: p. 55-65.
96. Yuan, W. and J. Varga, *Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38502-10.
97. Ma, C. and N. Chegini, *Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF-beta1*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(10): p. 950-4.
98. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1207-10.
99. Betsholtz, C., *Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 215-28.
100. Ostendorf, T., F. Eitner, and J. Floege, *The PDGF family in renal fibrosis*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(7): p. 1041-50.

101. Floege, J., F. Eitner, and C.E. Alpers, *A new look at platelet-derived growth factor in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(1): p. 12-23.
102. Uehara, G., et al., *Glomerular expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, -B chain and PDGF receptor-alpha, -beta in human diabetic nephropathy*. Clin Exp Nephrol, 2004. **8**(1): p. 36-42.
103. Boor, P., et al., *PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(5): p. 1323-31.
104. Bradham, D.M., et al., *Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10*. J Cell Biol, 1991. **114**(6): p. 1285-94.
105. Toda, N., et al., *CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis*. Inflamm Regen, 2018. **38**: p. 14.
106. Toda, N., et al., *Crucial Role of Mesangial Cell-derived Connective Tissue Growth Factor in a Mouse Model of Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42114.
107. Grotendorst, G.R., *Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(3): p. 171-9.
108. Liu, B.C., et al., *Role of connective tissue growth factor in mediating hypertrophy of human proximal tubular cells induced by angiotensin II*. Am J Nephrol, 2003. **23**(6): p. 429-37.
109. El Mesallamy, H.O., et al., *Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy*. Clin Biochem, 2012. **45**(9): p. 646-50.
110. Ihn, H., *Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(6): p. 681-5.
111. Banki, N.F., et al., *Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39938.
112. Degrell, P., et al., *Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy*. Life Sci, 2009. **84**(13-14): p. 389-93.

113. Junquiera, L.C., L.C. Junqueira, and R.R. Brentani, *A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen*. *Anal Biochem*, 1979. **94**(1): p. 96-9.
114. Failli, P., et al., *Losartan counteracts the hyper-reactivity to angiotensin II and ROCK1 over-activation in aortas isolated from streptozotocin-injected diabetic rats*. *Cardiovasc Diabetol*, 2009. **8**: p. 32.
115. Taira, M., et al., *Spirolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **589**(1-3): p. 264-71.
116. Coppey, L.J., et al., *ACE inhibitor or angiotensin II receptor antagonist attenuates diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Diabetes*, 2006. **55**(2): p. 341-8.
117. O'Sullivan, J.B. and S.B. Harrap, *Resetting blood pressure in spontaneously hypertensive rats. The role of bradykinin*. *Hypertension*, 1995. **25**(2): p. 162-5.
118. Hao, L., et al., *Effects of eplerenone on heart and kidney in two-kidney, one-clip rats*. *Am J Nephrol*, 2004. **24**(1): p. 54-60.
119. Parrish, A.R., *Matrix Metalloproteinases in Kidney Disease: Role in Pathogenesis and Potential as a Therapeutic Target*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017. **148**: p. 31-65.
120. Boor, P., T. Ostendorf, and J. Floege, *PDGF and the progression of renal disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2014. **29 Suppl 1**: p. i45-i54.
121. Grundy, S.M., et al., *Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. *Circulation*, 1999. **100**(10): p. 1134-46.
122. Ahmad, J., *Management of diabetic nephropathy: Recent progress and future perspective*. *Diabetes Metab Syndr*, 2015. **9**(4): p. 343-58.
123. Zhang, F., et al., *Effects of RAAS Inhibitors in Patients with Kidney Disease*. *Curr Hypertens Rep*, 2017. **19**(9): p. 72.
124. Boor, P., et al., *Treatment targets in renal fibrosis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22**(12): p. 3391-407.

125. Beenken, A. and A.S. Bomback, *Aldosterone breakthrough does not alter central hemodynamics*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2017. **18**(4): p. 1470320317735002.
126. Navaneethan, S.D. and E.L. Bravo, *Aldosterone breakthrough during angiotensin receptor blocker use: more questions than answers?* Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(10): p. 1637-9.
127. Nakagawa, T., *Diabetic nephropathy: Aldosterone breakthrough in patients on an ACEI*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(4): p. 194-6.
128. Goenka, L., R. Padmanaban, and M. George, *The Ascent of Mineralocorticoid Receptor Antagonists in Diabetic Nephropathy*. Curr Clin Pharmacol, 2018.
129. Kato, S., et al., *Anti-albuminuric effects of spironolactone in patients with type 2 diabetic nephropathy: a multicenter, randomized clinical trial*. Clin Exp Nephrol, 2015. **19**(6): p. 1098-106.
130. Nielsen, S.E., et al., *Spironolactone diminishes urinary albumin excretion in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria: a randomized placebo-controlled crossover study*. Diabet Med, 2012. **29**(8): p. e184-90.
131. Hicks, B.M., et al., *Angiotensin converting enzyme inhibitors and risk of lung cancer: population based cohort study*. 2018. **363**: p. k4209.
132. Lainscak, M., et al., *Safety profile of mineralocorticoid receptor antagonists: Spironolactone and eplerenone*. Int J Cardiol, 2015. **200**: p. 25-9.
133. Epstein, M., *Aldosterone blockade: an emerging strategy for abrogating progressive renal disease*. Am J Med, 2006. **119**(11): p. 912-9.
134. de Gasparo, M., et al., *Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro*. J Pharmacol Exp Ther, 1987. **240**(2): p. 650-6.
135. Makhloogh, A., et al., *Effect of spironolactone on diabetic nephropathy compared to the combination of spironolactone and losartan*. Nephrourol Mon, 2014. **6**(1): p. e12148.
136. Belgyógyászati Szakmai Kollégium, M.N.T.A.E.M.s.p., *A diabéteszes nephropathia vizsgálata és kezelése*. 2008.

137. Mavrakanas, T.A., et al., *Effect of ramipril alone compared to ramipril with eplerenone on diabetic nephropathy in streptozocin-induced diabetic rats.* Pharmacology, 2010. **86**(2): p. 85-91.
138. Han, S.Y., et al., *Spirolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1362-72.
139. Kang, Y.S., et al., *Effect of eplerenone, enalapril and their combination treatment on diabetic nephropathy in type II diabetic rats.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(1): p. 73-84.
140. Sanai, T., et al., *Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy.* Diabetologia, 2000. **43**(1): p. 91-100.
141. De Blasio, M.J., et al., *The superoxide dismutase mimetic tempol blunts diabetes-induced upregulation of NADPH oxidase and endoplasmic reticulum stress in a rat model of diabetic nephropathy.* Eur J Pharmacol, 2017. **807**: p. 12-20.
142. Nerlich, A. and E. Schleicher, *Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions.* Am J Pathol, 1991. **139**(4): p. 889-99.
143. Makino, H., et al., *Heparan sulfate proteoglycans are lost in patients with diabetic nephropathy.* Nephron, 1992. **61**(4): p. 415-21.
144. Qiao, Y., et al., *Resveratrol ameliorates diabetic nephropathy in rats through negative regulation of the p38 MAPK/TGF-beta1 pathway.* Exp Ther Med, 2017. **13**(6): p. 3223-3230.
145. Wyczalkowska-Tomasik, A., et al., *The Blocking on the Cathepsin B and Fibronectin Accumulation in Kidney Glomeruli of Diabetic Rats.* Int J Endocrinol, 2015. **2015**: p. 812825.
146. Ni, W.J., et al., *Renoprotective effects of berberine through regulation of the MMPs/TIMPs system in streptozocin-induced diabetic nephropathy in rats.* Eur J Pharmacol, 2015. **764**: p. 448-56.
147. Wang, J., et al., *Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice.* Cell Biochem Biophys, 2013. **67**(2): p. 537-46.

148. Takamiya, Y., et al., *Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 55-62.
149. Koszegi, S. and A. Molnar, et al., *RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition*. The Journal of Physiology-London, 2019. **597**(1): p. 193-209.
150. Yamamoto, T., et al., *Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1814-8.
151. Hathaway, C.K., et al., *Low TGFbeta1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. 5815-20.
152. Gupta, S., et al., *Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1389-99.
153. Murphy, M., et al., *Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5830-4.
154. Roostenberg, P., et al., *Temporal expression profile and distribution pattern indicate a role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2) in diabetic nephropathy in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(6): p. F1344-54.
155. Suzuki, H., et al., *Deletion of platelet-derived growth factor receptor-beta improves diabetic nephropathy in Ca(2)(+)/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha (Thr286Asp) transgenic mice*. Diabetologia, 2011. **54**(11): p. 2953-62.
156. Wang, S., et al., *Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 96-105.
157. Langham, R.G., et al., *Over-expression of platelet-derived growth factor in human diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(7): p. 1392-6.
158. Nakagawa, H., et al., *Immunohistochemical characterization of glomerular PDGF B-chain and PDGF beta-receptor expression in diabetic rats*. Diabetes Res Clin Pract, 2000. **48**(2): p. 87-98.

159. Ahn, J.H., et al., *Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the development of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rats*. *Diabetes Metab J*, 2012. **36**(2): p. 128-35.
160. Nagai, Y., et al., *Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts*. *Hypertension*, 2005. **46**(4): p. 1039-45.
161. Gilbert, R.E., et al., *Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition*. *Diabetes*, 1998. **47**(3): p. 414-22.
162. Lian, M., et al., *Long-term mineralocorticoid receptor blockade ameliorates progression of experimental diabetic renal disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(3): p. 906-12.
163. Nakagawa, T., et al., *Role of PDGF B-chain and PDGF receptors in rat tubular regeneration after acute injury*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(5): p. 1689-99.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK BIBLIOGRÁFIAI ADATAI

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Koszegi Sandor*** ; Molnar Agnes* ; Lenart Lilla ; Hodrea Judit ; Balogh Dora Bianka ; Lakat Tamas ; Szkibinszkij Edgar ; Hosszu Adam ; Sparding Nadja ; Genovese Federica et al. RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON 597 : 1 pp. 193-209. 17 p. (2019) **IF: 4,547**
2. Gellai Renata, Hodrea Judit, Lenart Lilla, Hosszu Adam, **Közzezi Sandor**, Balogh Dora, Ver Agota, Banki Nora F, Fülöp Norbert, Molnar Agnes, Wagner Laszlo, Vannay Adam, Szabo J Attila, Fekete Andrea. The role of O-linked N-acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY In press: p. In press. (2016). **IF: 3,611**
3. Lenart L, Hodrea J, Hosszu A, **Koszegi S**, Zelena D, Balogh D, Szkibinszkij E, Veres-Szekely A, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. PSYCHOPHARMACOLOGY 234: pp. 1-10. (2016). **IF: 3,308**
4. Hodrea Judit, Lénárt Lilla, Gellai Renáta, **Közzezi Sándor**, Wagner László, Bánki N Fanni, Vér Ágota, Vannay Ádám, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea. A diabeteshez társuló depresszió patomechanizmusa. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 66:(4) pp. 198-203. (2013) **IF: -**
5. Bánki Nóra Fanni, **Közzezi Sándor**, Wagner László, Lénárt Lilla, Varga Dóra, Gellai Renáta, Hodrea Judit, Vér Ágota, Szabó J Attila, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea. Új terápiás támpontok a diabéteszes nephropathia kezelésében: a renin–angiotenzin–aldoszteron-rendszer és a Na/K ATP-áz szerepe. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 64:(2) pp. 70-73. (2013) **IF: -**

Más témában megjelent publikációk

1. Hodrea Judit ; Balogh Dora B ; Hosszu Adam ; Lenart Lilla ; Besztercei Balazs ; **Koszegi Sandor** ; Sparding Nadja ; Genovese Federica ; Wagner Laszlo J ; Szabó Attila J et al. Reduced O-GlcNAcylation and tubular hypoxia contribute to the antifibrotic effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin in the diabetic kidney AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY 318 : 4 pp. F1017-F1029. (2020). **IF: 3,191**
2. Hosszu A ; Antal Z ; Lenart L ; Hodrea J ; **Koszegi S** ; Balogh DB ; Banki NF ; Wagner L ; Denes A ; Hamar P et al. Sigma1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY 28 : 1 pp. 152-165. 14 p. (2017) **IF: 8,665**

11. KÖSZÖNÖTNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Fekete Andreának a Ph.D. munkám során nyújtott fáradhatatlan szakmai segítségéért, tudományos szemléletformálásomért, valamint a feltétlen bizalmáért.

Köszönettel tartozom Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak a lehetőségért, hogy Ph.D. munkámat az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végezhettem.

Köszönettel tartozom az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának dolgozóinak a segítségéért, kiemelve Reusz György professzor úr, Antal Zsuzsanna, Vannay Ádám, Pap Domonkos, Kis Zoltán, valamint Veres Székely Apor önzetlen támogatását.

Hálás köszönettel tartozom a „Lendület” munkacsoport volt és jelenlegi tagjainak: Bánki Fanninak, Hodrea Juditnak, Hosszú Ádámnak, Lénárt Lillának, Balogh Dórának, Szkibinszkij Edgárnak és Gellai Renátának, a kísérletek tervezésében és kivitelezésében nyújtott segítségükért, köszönöm, hogy egymást támogatva, baráti légkörben dolgozhattunk a mindennapi munkám során.

Külön köszönettel tartozom Bernáth Máriának, aki kísérletek technikai kivitelezése során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom a családomnak az önzetlen támogatásukért és véget nem értő biztatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni feleségemnek, Fehér Szilviának, fiamnak, Sebőnek, hogy biztattak és támogattak a mindennapi munka, feladatok mellett a disszertáció elkészítésében.