

XXXII. OTDK Biológia szekció

A RAAS rendszer gátlásának szerepe a diabéteszes nefropátiában

Szkibinszkij Edgár

Biológia M.Sc. I. évfolyam

2014



Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Belső konzulens: Dr. Hermeszt Edit, egyetemi docens

SZTE-TTIK Biokémiai- és Molekuláris Biológiai Tanszék



Témavezető: Dr. Hodrea Judit, tudományos munkatárs

MTA-SE „Lendület” Diabétesz Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem
I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

1. A rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés.....	4
2.1 A diabéteszes nefropátia.....	5
2.2 A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)	6
2.2.1 A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer a vesében	8
2.3 Az epiteliális- mezenhimális tranzíció (EMT)	9
2.3.1 Az EMT szerepe fiziológiás és patológiás folyamatokban.....	10
2.3.2 Az EMT folyamata	10
2.3.3 Az EMT szignálrendszere	12
3. Célkitűzés	14
4. Anyagok és módszerek.....	15
4.1 Az 1-es típusú DM állatmodellje.....	15
4.2 Vérnyomás- és pulzusmérés	15
4.3 Vizsgálati csoportok	15
4.4 Hisztológia.....	16
4.5 Immunhisztokémia	17
4.6 Western-blot analízis	17
4.7 Statisztikai értékelés	18
5. Eredmények.....	19
5.1 Vérnyomás adatok.....	19
5.2 Hisztológia.....	20
5.2.1 Masson festés.....	20
5.3 Immunhisztokémia	22
5.3.1 Az α SMA fehérje kifejeződése a glomerulusokban	22
5.3.2 Az α SMA fehérje kifejeződése a tubulusokban	23
5.4 Western-blot analízis	24
6. Megbeszélés	25
7. Összefoglalás.....	27
8. Köszönetnyilvánítás	28
9. Irodalomjegyzék.....	29
10. Tételes szerzői hozzájárulás	33

1. A rövidítések jegyzéke

ACE: angiotenzin- I konvertáló-enzim	FSP-1: fibroblaszt specifikus protein-1	PAK1: p21-aktivált kináz 1
ACE2: angiotenzin I- konvertáló enzim 2	FTS-1: fibroblaszt-transzkripció hely-1	PAS: perjódsav-Schiff
Ang II: Angiotenzin II	GSK-3 β : glikogén-szintáz kináz-3 β	PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor
ANG III: angiotenzin III	HGF: hepatocita növekedési faktor	PI3K: foszfatidil- inozitol-3 kináz
ANG IV: angiotenzin IV	HK2: humán vese 2	PKD1: Protein-kináz D1
Ang: Angiotenzin I	hPTC: humán proximális tubulussejt	PRC2: Polycomb represszív komplex 2
ARB: angiotenzin II receptor blokkoló	ICAM1: intracelluláris adhézión molekula 1	ROCK: Rho asszociált kináz
AT1R: angiotenzin receptor 1 típus	JNK: JUN N-terminális kináz	ROS: reaktív oxigén fajták
AT2R: angiotenzin receptor 2 típus	LATS2: nagy tumorszupresszor 2	sCDP1: kis C-terminális domén foszfatáz 1
AT ₄ R: angiotenzin 4 receptor	LEF: limfocitaerősítő faktor	SPARC: Cys-ben gazdag savas szekretált protein
bHLH: hélix-hurok-hélix	MAPK: mitogén-aktivált protein kináz	STZ: streptozotocin
BMP7: csont-morfoгенetikus fehérje- 7	MasR: Mas receptor	TF: transzkripció faktor
EGF: epidermális növekedési faktor	MDM2: p53-mouse double minute 2	TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β
EMT: epiteliális-mezenhimális tranzíció	MMP: mátrix metalloproteináz	TIF: tubulointersticiális fibrózis
eNOS: endoteliális nitrogén monoxid szintetáz	NEP: neutrális endopeptidáz	TXA2: tromboxán A2
ERK: extracelluláris szignálszabályozó kináz	NO: nitrogén monoxid	Ub: ubiquitin
ET1: endotelin 1	ON: obstruktív nefropátia	VCMS: vaszkuláris simaizom sejt
FGF-2: fibroblaszt-növekedési faktor-2	PAI 1: plazminogén aktivátor inhibitor	ZEB: cink-ujj E-box-kötő
		ZO1: zonula occludens 1
		α SMA: α -simaizom aktin

2. Bevezetés

A cukorbetegség, diabétesz mellitusz (DM), jelentős egészségügyi probléma napjainkban. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség 2013-évi statisztikái szerint Európában, mintegy 56 millió, világszerte pedig megközelítőleg 382 millió cukorbeteg él. Ez a szám a 2011-évi adatokhoz (366 millió beteg) képest magasabb. Ha ez a tendencia fennmarad, akkor az előrejelzések szerint 2035-re a cukorbetegek száma elérheti az 592 milliót is. A magyarországi betegekről részletes információval sajnos nem rendelkezik az adatbázis, de a becslések alapján a magyar lakosság nagyjából 7 %-a él együtt a cukorbetegséggel [1], és ez a gyakoriság tovább növekedhet. A statisztikát torzítja, hogy a még nem diagnosztizált betegek száma igen magas [2].

A cukorbetegségnek két fő formája van, az 1-es típus és a 2-es típus, bár a DM kialakulhat terhesség alatt és egy egyéb körülmények között is, mint például gyógyszer- és kémiai toxicitás, genetikai rendellenességek, endokrinopátia, inzulin receptor rendellenességek vagy exokrin hasnyálmirigy betegség [3]. 1-es típusú DM-ben a hiperglikémia egy összetett genetikai és a környezeti faktorok kölcsönhatásából kialakuló autoimmun válasz eredménye [4]. A diabéteszesek táborában a legtöbb embert (betegek 85%-a) a 2-es típusú DM érinti, ahol a perifériás inzulin rezisztencia és a kompenzációs inzulin hiperszekréció következtében jelentősen csökken a szérum inzulin szintje [5]. A cukorbetegség számos komplikációval járhat együtt, melyek közül a hosszútávon kialakuló, az érrendszer károsodásával kapcsolatos szövődmények növelik a mortalitást. A tartósan magas glükóz direkt módon károsítja a vérereket, ami így mikro- és makrovaszkuláris szövődményekhez vezet. Mikrovaszkuláris szövődménynek számít a szem károsodása, azaz a retinopátia, a vese károsodása, azaz a nefropátia és az idegrendszer károsodása a neuropátia. A diabétesz makrovaszkuláris szövődményei miokardiális infarktus és stroke formájában manifesztálódhatnak. A vese károsodása tovább fokozza a makrovaszkuláris szövődmények kialakulását is [6]. A depresszió [7] és a demencia [8] szintén a diabétesz velejárója lehet.

A nefropátia klinikailag proteinúriával jellemezhető, később a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) folyamatos, akár 10-20 évig elhúzódó csökkenésével jár. A diabéteszes nefropátia (DNP) a felnőttkori krónikus veseelégtelenség leggyakoribb oka. Napjainkban kétféle vese pótló kezelés áll a krónikus vesebetegek rendelkezésére, az egyik a vese-dialízis, a másik pedig a vese transzplantáció [9]. Ezek a kezelések nagy kihívást jelentenek a betegek számára, hiszen életük a vese-pótló kezelés köré korlátozódik [10]. Másodsorban nagy kihívást jelent az

egészségügynek is, hiszen a krónikus vesebetegek tábora egyre növekszik [11], jelentős gazdasági terhet róva a társadalomra. A DNP pontos patomechanizmusa még nem ismert, megelőzése és kezelése egyelőre nem megoldott.

2.1 A diabéteszes nefropátia

A krónikus veseelégtelenség világszerte jelentős népegészségügyi és gazdasági probléma és egyre csak terjedő tendenciát mutat. Ennek a terjedő tendenciának a legfőbb oka a DM-es betegek számának növekedése. A cukorbetegség hosszú fennállásának szövődményeként kialakulhat a DNP, ami a végstádiumú veseelégtelenségek leggyakoribb oka a felnőtt populációban [12, 13]. A DNP az 1-es típusú diabéteszes betegek 30-40%-nál [13], míg a 2-es típusú diabéteszes betegek 10-20%-ánál [14] alakul ki, illetve 2-es típusú cukorbetegség esetén már a diagnosztizálás pillanatában is jelen lehet.

A szövettani és klinikai vizsgálatok alapján a DNP öt stádiumra osztható fel [15]. Az első fázisban a vese hiperfiltrációja és a vesesejtek térfogatának növekedése (hipertrófia) és a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) emelkedése figyelhető meg. A második stádiumban megjelenik az albumin (30-300 mg/nap) a vizeletben, aminek a jelenléte még nem állandó. Megfigyelhető a glomerulusok bazális membránjának megvastagodása valamint a mezangiális mátrix kiterjedése. A harmadik stádiumban már tartósan megfigyelhető az albumin a vizeletben és a vérnyomás is elkezd emelkedni, a GFR pedig csökkenni kezd. A bazális membrán vastagodása és a glomerulus mezangiumának expanziója tovább folytatódik. A negyedik stádiumban már egyre jelentősebb az albuminvesztés (>300 mg/nap). Szövettanilag glomeruloszklerózis, ateroszklerózis és krónikus tubulo-intersticiális károsodás figyelhető meg, melyek a vesefunkció romlásához vezetnek. A glomeruláris funkció romlása miatt csökken a vizeletképzés és a kiválasztás, ezáltal emelkedik a szérum kreatinin szint és nő a vérnyomás [16]. Az ötödik stádiumban drasztikusan csökken a működő nefronok száma, ami végül urémiához, veseelégtelenséghez vezet.

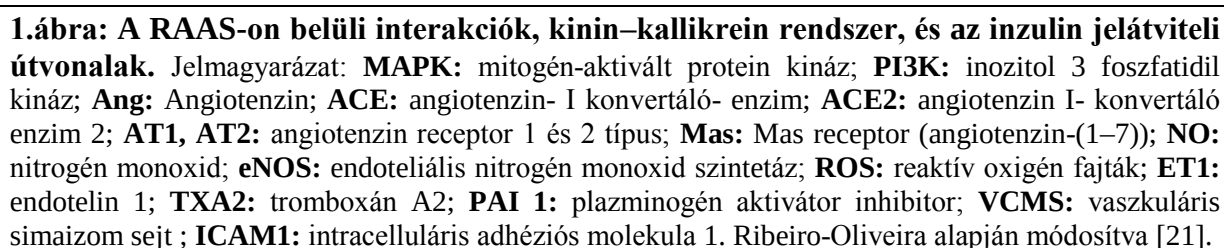
A csökkent veseműködés miatt csökken az eritropoetin termelés, ami vérszegénységhez vezethet. Emellett, zavart szenved a D-vitamin anyagcseréje, ami csökkenti az intesztinális kalcium felszívódását és fokozza az osteoporózist. A lipid-szintek (koleszterin, triglicerid) is emelkednek [17]. A napi vizelet mennyisége egyre kevesebb, jellemző az ödéma, fáradékonyság, kialakul a végstádiumú veseelégtelenség és vesepótló kezelés megkezdése válik szükségessé [16].

2.1.1 A diabéteszes nefropátia patomechanizmusa

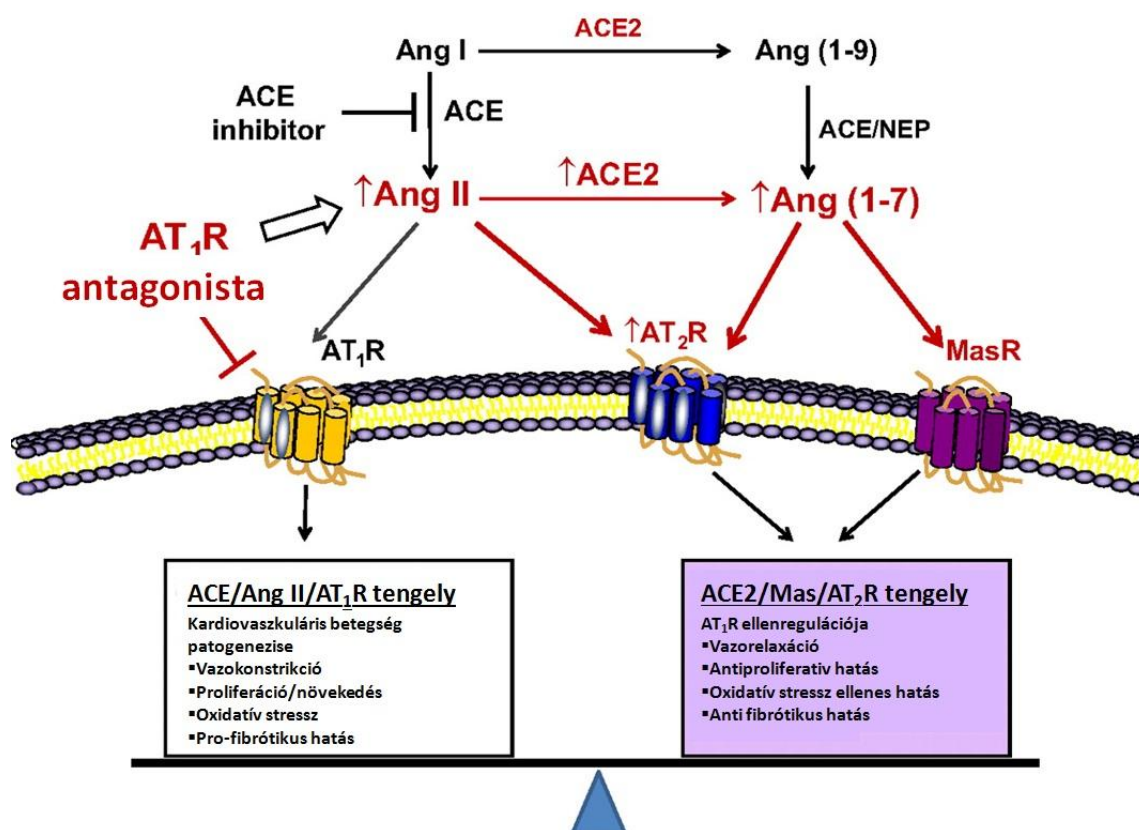
A DNP kialakulása egy soklépcsős, egymással nagyban összefüggő részekből felépülő folyamat. Számos kockázati tényezője van. A diabétesz fennállásának ideje és mértéke, a megemelkedett vérnyomás, a dohányzás és a fehérje fogyasztás mértéke nagyban befolyásolja a DNP alakulását [18]. A kórfolyamat beindításában kulcsfontosságú a magas vércukorszint [19]. Fenntartásában fontos a hiperglikémia, az aktiválódott renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS), a kialakuló ateroszklerózis és az emelkedett szisztémás vérnyomás, melyek hatása összeadódik. A hiperglikémia aktiválja a RAAS-t, míg a RAAS növeli az inzulinrezisztenciát és ezzel a vércukorszintet is. A vazokonstriktív hatás miatt romlik a hasnyálmirigy inzulin termelése, valamint romlik a vese vérellátása. Ez fokozza a RAAS-t, szabadgyök termelést indukál, aminek a következménye hiperlipidémia is lehet, mely erekre visszahatva növeli az érlemezsedés mértékét [20]. A magas vérnyomás rontja a vese keringését, ami tovább fokozza az ateroszklerózist és RAAS aktivációt [21]. A hiperglikémia, a hiperaktív RAAS, az ateroszklerózis és a hipertónia külön-külön is károsítják a vesét, de együttesen hatva súlyos nefrotoxikus hatást képviselnek, ami végül a vese funkcionális és struktúrális károsodásához vezet [22].

2.2 A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)

A RAAS felépítését és célszerveit az 1-es ábra szemlélteti. A RAAS fő effektor peptidje az Ang II, amely egy több lépéses folyamat eredményeképp képződik a májban termelődött angiotenzinogénből [23, 24]. A vese juxtaglomeruláris apparátusa által termelt renin az angiotenzinogént hasítva Ang I-et hoz létre. A tüdő erek endotéljében termelődő angiotenzin I konvertáló enzim (ACE) hatására az Ang I Ang II-vé alakul. Az ACE az Ang II termelésén kívül, az általános vazodilatátor bradikinin lebontásával is hozzájárul a vazokonstrikciónak [24]. Az Ang II stimuláló hatással bír a mellékvese kéreg zona glomerulosa sejtjeinek aldoszteron termelésére, ezzel befolyásolja a vese nátrium és víz visszaszívását [19].



A proximális tubulusokban AT₂R emelkedett expresszióját tapasztalták elhízott Zucker egerekben [29] és streptozotocin (STZ) kezelt diabéteszes patkányokban [30], aminek direkt hatása volt a nátrurezisre és a diurezisre.



2.ábra: A RAAS termékeinek hatása az AT₁R, AT₂R, MasR tengelyen. Az ábra az ACE2/MasR/AT₂R és az ACE/Ang II/AT₁R tengelyek ellentétes hatását mutatja be. Az AT₁R blokkolása csökkenti az AT₁R mediálta hatásokat, ezzel egy időben stimulálja az ACE2/MasR/AT₂R tengelyt, olyan módon, hogy Ang (1-7) képes stimulálni a ligand mentes MasR-t és/ vagy AT₂R-t az Ang II közvetítette folyamat mellett, ligand mentes AT₂R mellett. **ACE:** angiotenzin I konvertáló enzim; **NEP:** neutrális endopeptidáz; **Ang:** angiotenzin; **MasR:** Mas receptor; **AT₂R:** angiotenzin II receptor; **AT₁R:** angiotenzin I receptor. Gaspari alapján módosítva [31].

2.2.1 A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer a vesében

A megbetegedett vesében a veseelégtelenség progressziója gyakran hipertenzióval, proteinúriával és tubulointersticiális fibrózissal (TIF) kapcsolt [32, 33]. Az előrehaladott vesebetegség és a TIF lefolyásában az ANG II kulcsfontosságú szereppel bír, erős vazokonstriktív hatásából adódóan megemeli a glomerulusokban uralkodó nyomást és egyéb vesesejteket is károsít. Ezen hatásaival fokozza a TIF kialakulását [34-36]. Úgy gondolják, hogy TIF-ben a tubuláris epitél sejtekben aktiválódott lokális RAAS szerepe jelentősebb, mint a juxtaglomeruláris vagy a szisztémásan aktiválódott RAAS-é [37]. Az ANG II koncentrációja proximális tubulus folyadékban 100-500-szerese a vérplazmában mért értékének [37, 38].

A legtöbb patogén hatás AT₁R-on keresztül érvényesül, amelyet a tubuloepiteliális sejtek a proximális tubulusokban fejeznek ki [39, 40]. Immortalizált humán tubuloepiteliális sejtvonalakon (hPTC) végzett kísérletek rámutattak arra, hogy az ANG II indukálta az oxidatív stressz markereit, az adaptív válasz elemeit, valamint felülírta a stressz válasszal kapcsolatos gének expresszióját [41]. Ezen hatások jelentős része az AT₁R-on keresztül érvényesült, azonban felmerült a nem-AT₁R mediált útvonalak fontossága is.

Eddig két, olyan nem- AT₁R és AT₂R receptort találtak, amely képes ANG II kötésére, az egyik az angiotenzin 4 receptor (AT₄R) és a Mas receptor (MasR). Az AT₄R nagy affinitással köti meg az ANG IV (ang 3-8) fragmentjét, de ezt eddig csak HK-2 sejtvonalakban írták le [34, 42-44]. Az AT₄R patológiai jelentősége még nem tisztázott, de kimutatták, hogy az exogén ANG IV AT₄R-on keresztül stimulálja a plazminogén-aktivátor inhibitor (PIH) HK-2 sejtekben, ami szerepet játszhat a HK-2 sejtekben végbemenő TIF-ban [34].

A másik leírt receptor a Mas, Ang (1-7) fragment kötésére képes és eddig csak a patkány elsődleges proximális tubulusaiban figyeltek fel jelenlétére. Az Ang III, Ang IV és az Ang (1-7) az angiotenzin I vagy az angiotenzin II hasítása során képződik, az angiotenzin konvertáló enzim (ACE)-2 hasítása révén. Ez az enzim homológ a klasszikus ACE-el, viszont nem blokkolható ACE-gátló drogokkal [45, 46]. Az Ang (1-7) szerepet játszik a fibrózis kivédésében szívben és májban [47, 48].

2.3 Az epiteliális- mezenhimális tranzíció (EMT)

A végstádiumú vesebetegség miatt Európában mintegy 250 ezer ember kényszerül vesepótló kezelésre. E betegség hátterében legtöbbször a vese szövetének fibrotikus elváltozása áll [49]. A fibrózis eredményeképpen a szövetek mátrixállománya feldúsul, az intersticiális teret fibroblaszt sejtek árasztják el, megbontva ezzel a szerv szöveti szerkezetét. Végstádiumú vesekárosodás esetén jól megfigyelhetőek ezek az elváltozások. Autoimmun reakció, perzisztens infekció és kémiai ágensek is kiválthatnak vesefibrózist [50-52], a különböző kiváltó okoktól függetlenül, ezen folyamatok mechanizmusa kevésben tér el egymástól. A gyermekkori- és a felnőttkori szerzett veseelégtelenség oka gyakran az obstruktív nefropátia (ON), amelyet sérült vesében jelentős mértékű gyulladás kísér. Ezt a folyamatot a makrofágok és limfociták intersticiális inváziója jellemzi. A szakirodalomban található számos tanulmány szerint ez a gyulladás indukálja az epiteliális-mezenhimális tranzíció (EMT) beindulását és végső soron a szöveti fibrózis kialakulását [53].

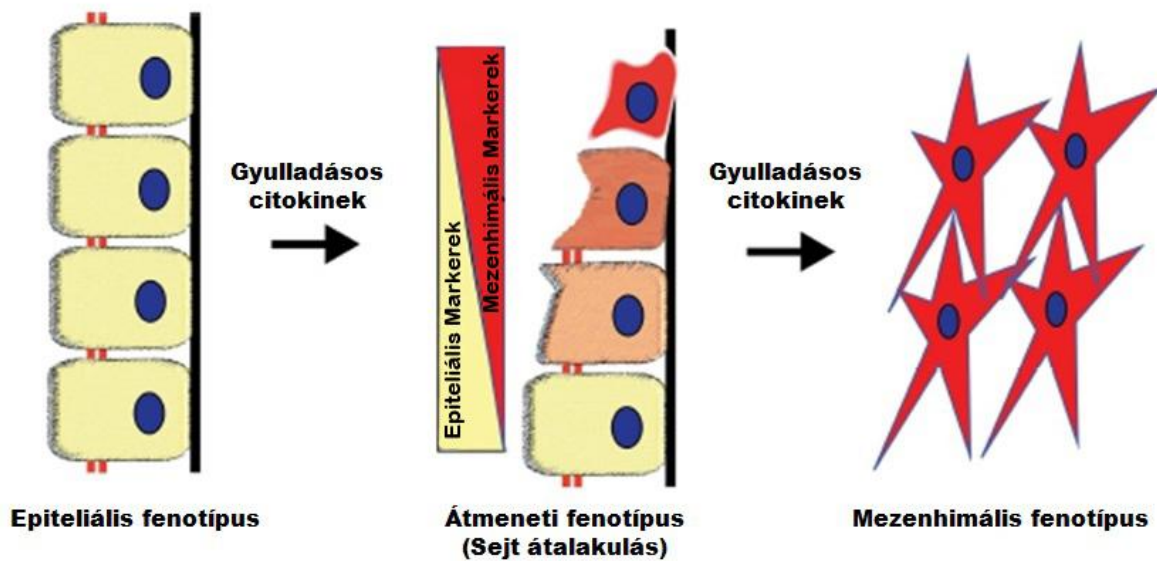
2.3.1 Az EMT szerepe fiziológiás és patológias folyamatokban

Az EMT során epiteliális sejtek átalakulásáról beszélünk. A folyamat részeként az epiteliális sejtek elveszítik adhéziós tulajdonságaikat, apikális- bazális polaritásukat valamint extracelluláris mátrix fehérjéket kezdenek termelni. Az EMT a szervezetben végbemehet fiziológiás, illetve patológias folyamat részeként [54]. Ezek alapján három EMT altípust definiáltak. Az I. típusú EMT az embrionális fejlődéshez köthető. A gasztruláció során az epiblaszt rétegéből, a primitív csík mentén sejtvándorlás indul az epiblaszt és a hipoblaszt által elhatárolt üregbe, a blasztocölbe. Ezek a sejtek hozzák létre a mezodermát, a majdani belső szervek diszkuszait [55]. A II. típusú EMT a szöveti hegesedés folyamatában, a III. típusú EMT pedig onkogenezisben tölt be központi szerepet [56]. Az EMT három típusában különbözőek a kiindulási sejtek (primitív, szekunder vagy tumoros epitél sejt), az aktiválódó szignál-transzdukciós utak és a létrejövő sejtípusok (mezenchimális sejt, miofibroblaszt, áttétképző tumoros sejt).

A vese fibrotikus átalakulásában a II-es típusú EMT működik közre, de ugyanezt a típust figyelték meg a szív, a tüdő és máj fibrotikus elváltozásával kapcsolatban is [57-60].

2.3.2 Az EMT folyamata

Elsőként, 1995-ben Hay és mtsai. csirkeembrióból nyert epiteliális sejtek mezenhimatikus átalakulását és az ezt szabályozó faktorokat vizsgálták [61]. Egy pluripotens sejt a differenciálódása során több tulajdonságot is elveszít, miközben egy meghatározott irányba fejlődik tovább és felveszi az adott szövettípusra jellemző fenotípust [62, 63]. Ez azt jelenti, hogy a differenciálódó sejt fenotípust vált és egyre specifikusabb funkciója lesz. Az EMT során (3. ábra) a bazális membránon ülő epitél sejtek mezenhimális fenotípust vesznek fel, mind alakra, mind expressziós mintázatra [64-66].



3.ábra: Az epitheliális-mezenhimális tranzíció során bekövetkező fenotípusos változások. Gyulladásos citokinek és egyéb faktorok hatására megindul az epitheliális sejtek fenotípusának mezenhimális fenotípus felé tolódása. Tsai alapján módosítva [67].

A folyamat beindításában több növekedési faktor, gyulladásos mediátor, hormon és extracelluláris stimulus vesz részt, bonyolult ám összehangolt jelátviteli utakat aktiválva. Egér-kísérletekben az EMT-t indukáló növekedési faktorok, mint például a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) [68] , a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), az epidermális növekedési faktor (EGF) és a fibroblaszt-növekedési faktor-2 (FGF-2) aktiválják az inflammatorikus sejteket, a fibroblasztokat, valamint a kemokinek és mátrixmetalloproteinázok (MMP-2,-3 és -9) felszabadulását váltják ki [69]. EMT során az epitheliális sejtek orsó alakot vesznek fel, a sejtkapcsoló struktúráik felszakadoznak, elvesztik adhéziós tulajdonságaikat [55, 70]. Az epitheliális markerek mennyisége lecsökken (E-cadherin, claudinok, occludinok, zonula occludens-1 és desmoplakin). Az adhéziós proteinek és a mikrovillusok elvesztése a sejt apikális-bazális polaritás viszonyainak megszűnésével jár. A sejtekben citoszkeleton remodeling történik, valamint beindul a *de novo* α -simaizom aktin (α SMA) termelés [68, 71]. Az átalakult sejtek migrációs kapacitása jelentősen megnő, ezáltal invázióra képessé válnak. Az átalakult sejtek MMP-ket termelve szabaddá teszik az utat saját maguk számára a lamina basalis degradációja által. A folyamat utolsó lépésében, az így létrejött miofibroblasztok szabadon migrálhatnak az interstíciumba, ahol további növekedési faktorokat és citokinek termelve fenntartják a folyamatot.

A citoplazmatikus α SMA fehérje a mikrofilamentumok csoportjába tartozik, ezáltal a citoszkeleton megformálásában van szerepe. Jelenléte megfigyelhető az erek falában, a

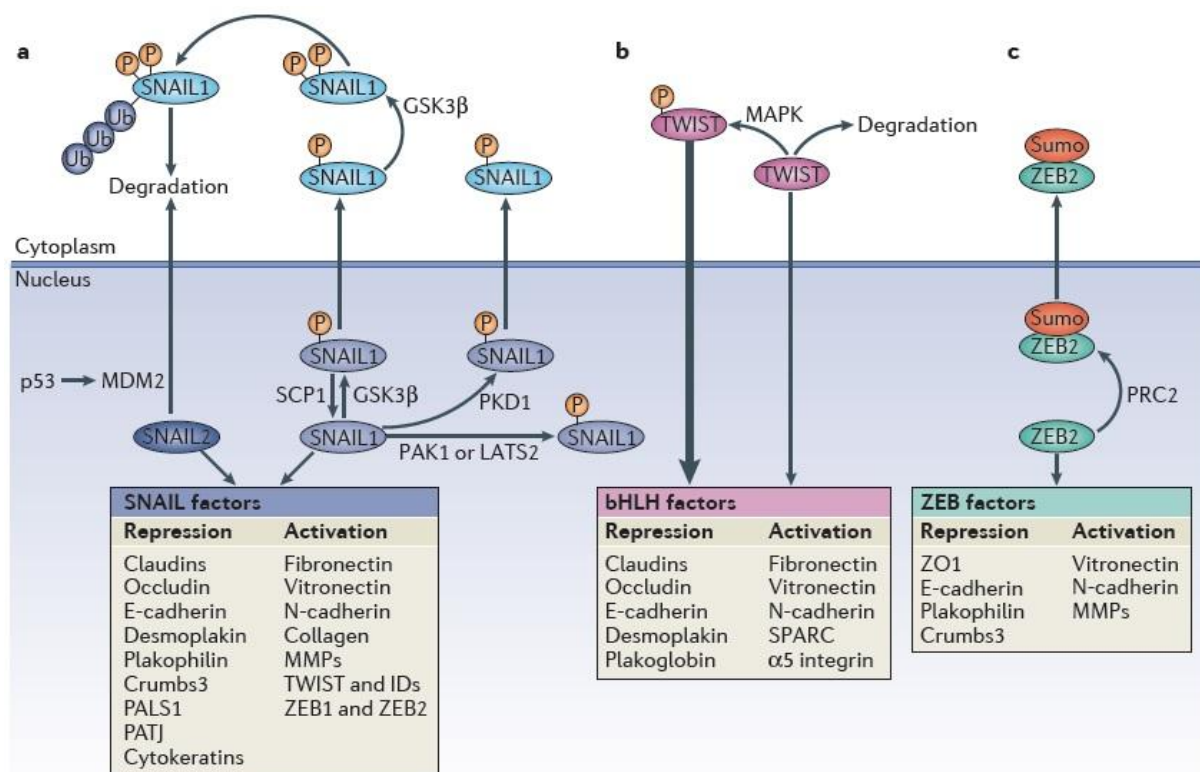
bélizomzat mukózus és izom rétegében és egyéb szervek kötőszövetes rétegeiben [72].

Emlős sejtekben hatféle aktin típust határoztak meg: két barázdált típust (α -szkeletális és α -kardiális), két simaizom aktin típust (α SMA és γ -enterális simaizom aktin) és két nem izom típusú citoplazmatikus aktint (β -aktin és γ -aktin) [73]. Az egyes izoformák eltérő funkcióval bírnak [74]. Masszi és mtsai. meghatározták, hogy a TGF- β erős regulátora az α SMA expresszióknak LLC-PK1/AT1 sejtekben [75]. Kísérleteinkben az α SMA-t markerként használtuk és mértük mennyiségi valamint lokalizációs változásait az egyes gyógyszeres kezelések hatására.

2.3.3 Az EMT szignálrendszere

Az EMT során bekövetkezett változások összetett intracelluláris szignalizációkat indítanak be [76](4.ábra). Több kináz fehérje aktiválódik, például a Ras/Rho GTPáz, a ROCK (Rho asszociált kináz), az Src tirozinkináz, Wnt-1, a Smad 2 és 3, a p38 mitogén aktivált proteinkináz, az extracelluláris szignálszabályozó kináz (ERK) és a foszfatidil- inozitol-3 kináz (PI3K).

Összehangolt működésük által csökken a sejtek közötti adhézió, megváltozik a citoszkeleton szerkezete és nő a sejt migrációs kapacitása. A fent említett jelátviteli utak nagy része a glikogén-szintáz kináz- 3 β (GSK-3 β) –t aktiválja, amely foszforilálja a β -catenint és aktiválja a Snail transzkripciós faktort. A β -cateninek a sejtkapcsoló struktúrák kialakításában vesznek részt, az EMT-ben kettős szerephez jutnak. Egyrészt hozzákapcsolja a kadherineket a citoszkeletonhoz, másrészt komplexet képez a limfocitaerősítő faktor (LEF) transzkripciós faktor család tagjaival és kotranszkripciós aktivátorként szolgál [77], így befolyásolja a Snail transzkripciós faktor szintjét [78]. Csökkenti az epiteliális sejtekre jellemző markerek mennyiségét (claudin, occludin, citokeratin), ezzel egy időben növeli a mezenhimális markerek szintjét (fibronektin, vimentin, N-kadherin). A Snail továbbá védi a sejtet az apoptózistól, gátolja a sejtosztódást és fokozza az MMP-k expresszióját.



4.ábra: A főbb EMT-ben résztvevő transzkripciós faktorok szerepe és szabályozása.

Az EMT-t SNAIL, cink-ujj E-box-kötő (ZEB) és hélix-hurok-hélix (bHLH) transzkripciós faktorok (TF) vezérlik, amelyek represszálják az epiteliális markergéneket, viszont a mezenhimális fenotípussal kapcsolatos géneket aktiválják. Poszttranszlációs módosítások szabályozzák az aktivitásukat és a sejten belüli lokalizációjukat és stabilitásukat. **a:** a glikogén-szintáz-kináz-3 β (GSK3 β) SNAIL1-et foszforilálja, mely következtében kijelölődhet ubiquitin (Ub) mediálta lebontásra vagy facilitálhatja a sejtmagból való kijutását. Protein-kináz D1(PKD1) szintén SNAIL1 nukleáris exportját idézi elő. Viszont a SNAIL1-t a p21-aktivált kináz 1 (PAK1) vagy a nagy tumorszupresszor 2 (LATS2) általi foszforilálása vagy a kis C-terminális domén foszfatáz 1 (sCDP1) általi defoszforilálása a sejtmagban tartja és fokozza az aktivitását. A SMAD2 degradálódik a p53-mouse double minute 2 (MDM2) komplex p53 mediálta felhalmozódása miatt. **b:** TWIST-t MAPK, p38, JUN N-terminális kináz (JNK) és ERK foszforilálhatja, ezzel megvédi a degradációtól és serkenti az importját a sejtmagba, hogy elláthassa funkcióját. **c:** ZEB2 a Polycomb represszív komplex 2 (PRC2) által SUMOilálódik, így később kikerül a nukleusból és lecsökken az aktivitása. **E-Kadherin:** epitheliális kadherin; **ID:** a differenciáció inhibitora; **MMP:** mátrix metalloproteináz; **N-kadherin:** neuronális kadherin; **PALS1:** Lin-7 asszociált protein 1; **PATJ:** PALS1-asszociált tight-junction fehérje; **SPARC:** Cys-ben gazdag savas szekretált protein; **ZO1:** zonula occludens 1 [79].

A fibroblaszt-transzkripciós hely- 1 (FTS-1) kulcsfontosságú szabályozó elem, amely általában megtalálható az EMT-ben szerepet játszó gének 5' szabályozó régiójában. Szabályozza a fibroblaszt specifikus protein-1 (FSP-1), a Twist, a Snail1, a HMGA2, a LEF1, az ETS-1, az E-kadherin, a β -catenin, a zonulin-1, az α SMA és a vimentin mennyiségét, így az EMT mechanizmusát is [80]. Az EMT-t aktiváló faktorok gátlása illetve a negatív regulátorok stimulálása által az EMT megfordítható vagy felfüggeszthető. Korábbi kutatások

a csont-morfogenetikus fehérje- 7 (BMP7) és a hepatocita növekedési faktor (HGF) gátló hatásáról számoltak be [81, 82].

Ez a két molekula részt vesz a vese korai fejlődésében és a vese tubuláris sejtjeinek fenotípusának fenntartásában. Korábban leírták *in vivo* renoprotektív hatásukat [83, 84]. A BMP7 a TGF- β fehérje endogén kompetitív antagonistája, amely a Smad rendszeren keresztül gátolja az EMT-t, így a vese-, a máj-, a tüdő fibrotikus elváltozását. A HGF mitogén, angiogenetikus, angioprotektív, morfogenetikus és antiapoptotikus hatással bír. Gyulladást követően mennyisége vesében megemelkedik és stabilizálja az epiteliális fenotípust. Ezzel csökkenti a mezenhimális átalakulást és a szöveti destrukció mértékét.

A RAAS-t és az EMT-t felölő kísérleteink során felmerült a kérdés, hogy vajon az 1-es típusú DM indukálta DNP-ben a monoterápiában alkalmazott RAAS gátló szerek hogyan hatnak a diabéteszes veseszövetre.

3. Célkitűzés

Kísérleteink célja volt, hogy a RAAS gátló kezelések esetleges renoprotektív hatásait a vérnyomáscsökkentő hatásuktól függetlenül vizsgáljuk az 1-es típusú diabétesz rágszálómodelljében. Ezért a RAAS inhibítorokat non-presszor dózisokban alkalmaztuk. A vesék állapotának vizsgálata során értékeltük az α SMA mennyiségi és lokalizációs változásait vesében, emellett tanulmányoztuk a vesék szövettani átalakulásait mind diabéteszben, mind pedig RAAS gátló kezeléseket követően.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Az 1-es típusú DM állatmodellje

Kísérleteinket 175-200 gramm súlyú, hím, Wistar patkányokon (Toxicoop Kft, Budapest, Magyarország) végeztük. A patkányokat állandó hőmérsékleten (21°C), 75% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatoknak állandóan elérhető standard rágszálótápot és csapvizet biztosítottunk.

Munkánkat a Magyar Köztársaság állatvédelmi és állatkísérletekkel kapcsolatos törvényeinek (1998/XXVIII.) betartásával, a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelvei alapján végeztük.

A diabéteszt egyszeri, nagy dózisú (65 mg/ttkg , *ip.*), citrátban oldott (0,1 M; pH=4,5) streptozotocinnal (STZ, Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) indukáltuk. 72 órával az STZ injekciót követően, vénás vérben ellenőriztük az állatok vércukorértékét tesztcsíkos Dcont Trend vércukormérő készülékkel (77 Elektronika Kft, Budapest, Magyarország). A cukorbetegség alsó határaként a 15 mmol/l vércukorértéket fogadtuk el, ennél alacsonyabb vércukor érték esetén kizártuk az állatot a vizsgálatból.

4.2 Vérnyomás- és pulzusmérés

Vizsgálataink során a 2 hetes RAAS gátló kezelés és a mintapreparálás előtt mértük az állatok vérnyomását és pulzusát CODA Standard Tail-cuff (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) módszerrel. Az állatokat egy melegítőpárnán lévő hengerben legalább 37 °C-os testhőmérsékleten tartottuk, majd miután megnyugodtak, a vérnyomás és pulzusmérésre alkalmas mandzsettákkal mértük a szisztolés és diasztolés vérnyomást, az artériás középnyomást, valamint a pulzust. Minden állatnál több alkalommal, legalább 3 mérést végeztünk. A módszer pontossága 95%-ban egyezik a gold standardként használt telemetriás eljárással [85]. Mivel nem-invazív módszer, kevésbé megterhelő az állatoknak, ami fontos szempont, mivel a kísérlet utolsó szakaszában az állatok már rossz, urémiás állapotban vannak.

4.3 Vizsgálati csoportok

A diabétesz 5 hetes fennállását követően 2 hétig kezeltük az állatokat (n=6/csoport) az alábbi RAAS gátlókkal (non-presszor dózisok) *per os*, izotóniás sóoldatban oldva:

1. ACE inhibitor *enalapril* (40 mg/ttkg/nap) vagy *ramipril* (10 µg/ttkg/nap)
2. ARB *losartán* (20 mg/ttkg/nap);

3. non-szelektív aldosteron antagonistá *spironolaktonnal* (50 mg/ttkg/nap);
4. szelektív aldosteron antagonistá *eplerenonnal* (50 mg/ttkg/nap);
5. izotóniás sóoldattal, mint vehikulummal.

Kontrollként korban és testtömegben megfelelő patkányokat használtunk. A 2 hetes RAAS gátló kezelést követően az állatokat ketamin-xylazin oldattal (8:2 arányú, *ip.*) altattuk. Az eltávolított veséket egyenlő darabokra osztottuk és 4 % pufferelt formalinban (pH=7,4) szobahőmérsékleten vagy szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80 °C - n tároltuk.

4.4 Hisztológia

A hagyományos hisztológiai vizsgálatokhoz a vesék egy részét formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Az intersticiális fibrózis megítélésére Masson festést, míg a mezangiális mátrix expanzió értékelésére perjódsvav Schiff (PAS) festést alkalmaztunk.

A Masson festés három (A, B, C) oldat felhasználásával történik. Az „A” oldat fuchsin sav, ciklidin ponceau, jégacet (100%-os ecetsav) és desztilláltvíz tartalmú, a citoplazmát festi pirosas-rózsaszínes árnyalatúra. A „B” oldat foszfomolibdénsavat és desztillált vizet tartalmaz, ez az oldat stabilizáló hatású. A „C” oldat Light green SF yellowish-ből, jégacetből és desztillált vízből tevődik össze, ez kékes-zöldre festi a kollagén rostokat. A sejtmagok festésére hematoxylint használnak [86, 87].

Az alap PAS festés szénhidrátok, szűkebb értelemben az 1-2-glikolok jelenlétét hivatott kimutatni. A perjódsvav-Schiff reakció során az oxidálódó szénhidrátokon aldehid csoportok képződnek, amelyeket a Schiff reagens kondenzál. Ennek a reakciónak az eredménye a püspöklila festődés, amely szénhidrátok jelenlétére utal [88, 89].

A mezangiális mátrix a glomeruluson belül található, erősen PAS pozitív régió, melynek a glomerulus teljes területéhez viszonyított mennyiségét *Adobe Photoshop* és *Scion image* szoftverek felhasználásával vizsgáltuk. Ilyen módon metszetenként 400X nagyításban 10-15 glomerulus mezangiális mátrix tartalmát mértük le, melyekből átlagot számoltunk.

A Masson festés során kéken festődő fibrotikus szövet teljes területéhez viszonyított arányát 200X nagyítású képeken elemeztük *Adobe Photoshop* és *Scion image* szoftverek segítségével.

4.5 Immunhisztokémia

A -80°C-on tárolt, 5 µm vastag fagyasztott vesemetszeteket kiolvastottuk, majd nedves kamrában, szobahőmérsékleten, 60 percig inkubáltuk foszfát pufferolt sóoldatban (PBS) higított primer ellenanyaggal (mouse anti αSMA, 1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA). A metszeteket 10 percig mostuk PBS-el, majd 30 percig jelöltük a fluoroforral konjugált másodlagos ellenanyaggal (Alexa 488 anti-mouse, 1:100 higításban, Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország). 10 percig mostuk desztillált vízben és a sejtmagokat Hoechst 33342-vel festettük meg (1:1000, Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország). A metszeteket száradás után Vectashield Mounting Mediummal (Vector Labs., Biomarker Kft., Budapest, Hungary) fixáltuk, fedőlemezrel lefedtük, majd az αSMA renális lokalizációját konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss GmbH., Jena, Németország) 63X-os objektívvel vizsgáltuk.

4.6 Western-blot analízis

Az *in vivo* állatmodelljeink kapcsán 100 mg veseszövetet hűtött (4°C) lizáló pufferben: [10 mM tris(hidroximetil)aminometán (TRIS) hidrogénklorid (HCl) (1 M) pH=8,0; 60 mM N-2-hidroxietilpiperazini-N-etánszulfonsav (Hepes); 100 mM nátriumklorid (NaCl); 0,75 mg/l leupeptin; 1 mM EDTA; 1mM/l etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA) (0,5 M); 0,5 mM fenilmetánszulfonil fluorid (PMSF); 0,1 mM ditiotreitól] (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) Fastprep RP120 homogenizátorral homogenizáltuk. A minták összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg Bradford-reagens felhasználásával. A minták fehérje koncentrációját 1 µg/µl-re állítottuk be.

A fehérjeizolátumot 4x minta pufferben (12,5 mM TRIS-HCl pH=6,7; 4,0 % szódium dodecil szulfát (SDS); 1mM EDTA; 15 % glicerol; 0,01 % brómfenolkék) szolubilizáltuk, majd 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen (BioRad Precast Gel) futtattuk meg. Mintáink mellett párhuzamosan molekulásúly markert (Precision Plus Protein Standard Dual Color, Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország) futtattunk. A blottolás során az SDS-poliakrilamid gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország) blottoltuk (Turbo-blot Turbo Transfer System, Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország), TRIS-HCl, glicin és metanol tartalmú standard transzfer pufferben. A fehérjetranszfer sikerességét 1 % Ponceau S (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország), 25 % ecetsav (Reanal Kft, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékkel ellenőriztük.

Ezután a blottmembránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül blokkoló oldatban (5 % zsírmentes tejpor, 1X PBS puffer) inkubáltuk. Blokkolás után a membránt mosó oldatban (1 % zsírmentes tejpor, 0,1 % Tween20 detergens, 1X PBS puffer) szobahőmérsékleten, egy órát inkubáltuk az elsődleges specifikus ellenanyaggal mouse α SMA 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA) hígításban. 4 x 15 perc mosást követően a másodlagos, torma-peroxidázzal konjugált ellenanyaggal goat anti-mouse 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA) a membránokat 30 percig inkubáltuk, szobahőmérsékleten, majd további mosásokkal (4 x 15 perc) távolítottuk el a feleslegben kötött ellenanyagot. Az ellenanyagot megkötött helyek kemilumineszcens szignálját ECL plus reagenssel (GE Healthcare Hungary, Budapest, Magyarország), VersaDoc 5000 MP (Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország) géldokumentációs rendszerrel detektáltuk és *Quantity One* szoftverrel denzitometráltuk.

4.7 Statisztikai értékelés

A statisztikai elemzést *GraphPad* statisztikai programmal végeztük, az eredményeket átlag $\pm$ SD adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

A hisztológiai eredményeket Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. A különböző csoportok vérnyomás és a különböző fehérjék mennyiségét ANOVA teszttel hasonlítottuk össze Newman-Keuls post-hoc teszttel kiegészítve.

5. Eredmények

5.1 Vérnyomás adatok

A RAAS gátlók dózisait irodalmi adatok és kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján választottuk, úgy, hogy azok ne befolyásolják az állatok artériás középnyomását. Az 1. Táblázatban látható, hogy sem a diabétesz sem a különböző kezelések nem okoztak változást az állatok artériás középnyomás értékeiben.

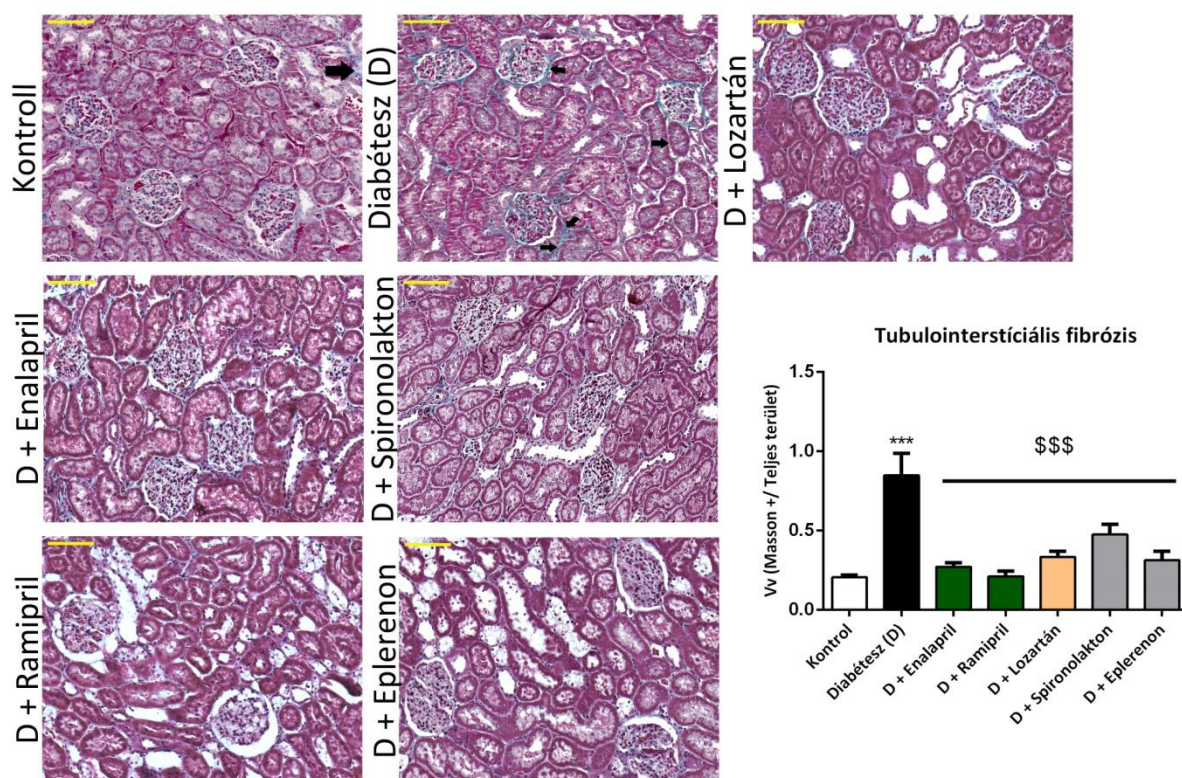
	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Ramipril	D+Lozartán	D+Spironolakton	D+Eplerenon
Artériás középnyomás (Hgmm)	73 ± 11	69 ± 17	65 ± 6	72 ± 7	74 ± 14	77 ± 20	72 ± 12

1. Táblázat. Kontroll (K), Diabéteszes (D) és Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) gátlókkal kezelt diabéteszes állatok artériás középnyomás értékei, n= 6/csoport.

5.2 Hisztológia

5.2.1 Masson festés

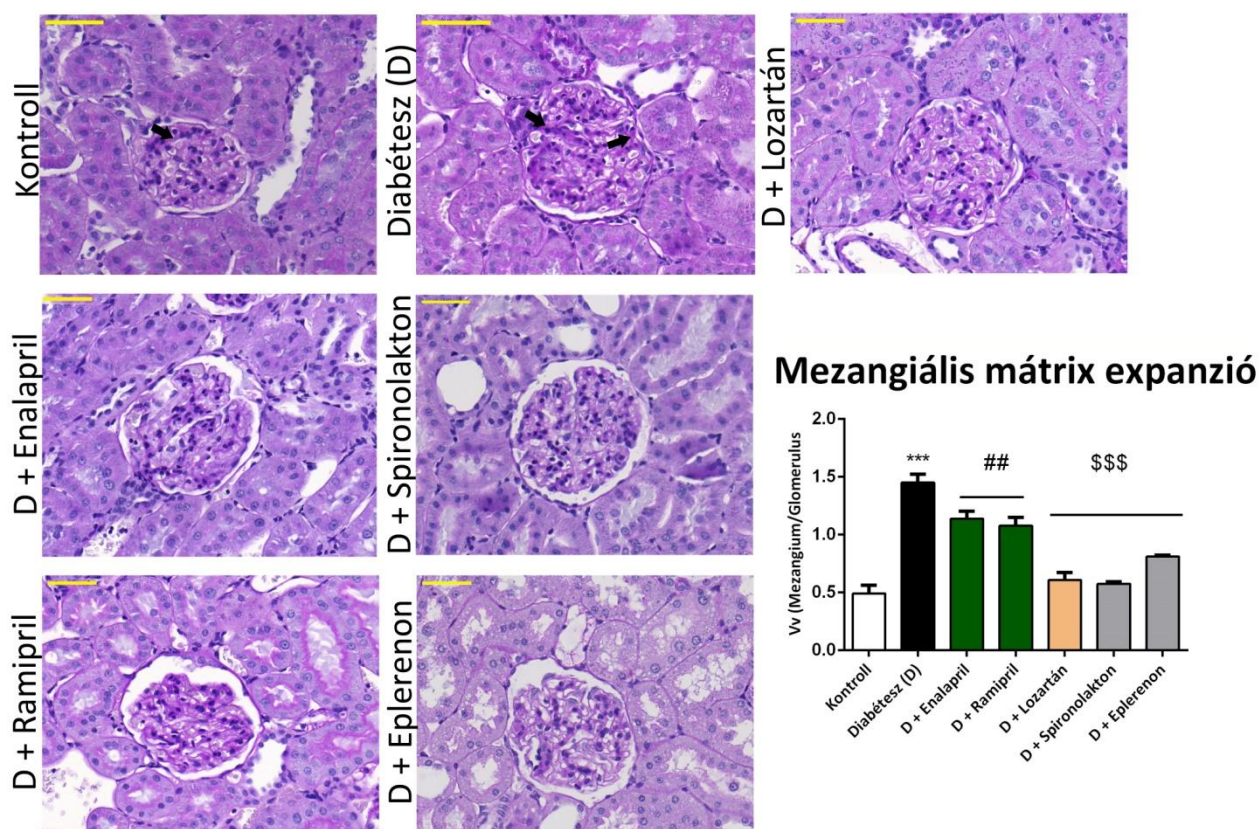
A Massonal festett metszeteken a kontroll állatokban szinte elhanyagolható mennyiségű kék festődés figyelhető meg. A diabéteszes állatok veséjében megjelent a DNP-re jellemző hisztológiai elváltozás, a kontroll állatokhoz képest nagyobb mennyiségű Masson pozitív terület detektálható. Az összes alkalmazott RAAS gátló hatékonyan mérsékelte a diabétesz indukálta szöveti károsodást, egyértelműen csökkent az intersticiális fibrózis mértéke.



5.ábra: Hisztológia 1. Masson festett vesemetszetek kontroll (K), diabéteszes (D) illetve enalaprilrel, ramiprilrel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt állatokból. Kék: fibrótikus szövet. A diagramm a tubulointersticiális fibrózis kvantifikált értékeit mutatja. Objektív: 20X. Lépték: 100 μ m, n=6 / csoport, *** K vs. D $p < 0,0001$; \$\$\$ D vs. RAAS gátlók $p < 0,0001$.

5.2.2 Mezangiális mátrix expanszió

A kontroll perjódsv- Schiff (PAS) festett vesemetszeten tág kapilláris lumen rajzolódott ki a glomeruluson belül. Streptozotocin indukálta diabéteszben kialakultak a szövettani károsodások. A glomeruluson belüli erős PAS pozitív régió (püspöklila), a kapillárisok lumenét összenyomó, kitágult mezangiális mátrixot tükrözi. Valamennyi RAAS gátló hatékonyan mérsékelte a diabétesz indukálta a glomerulus károsodását.

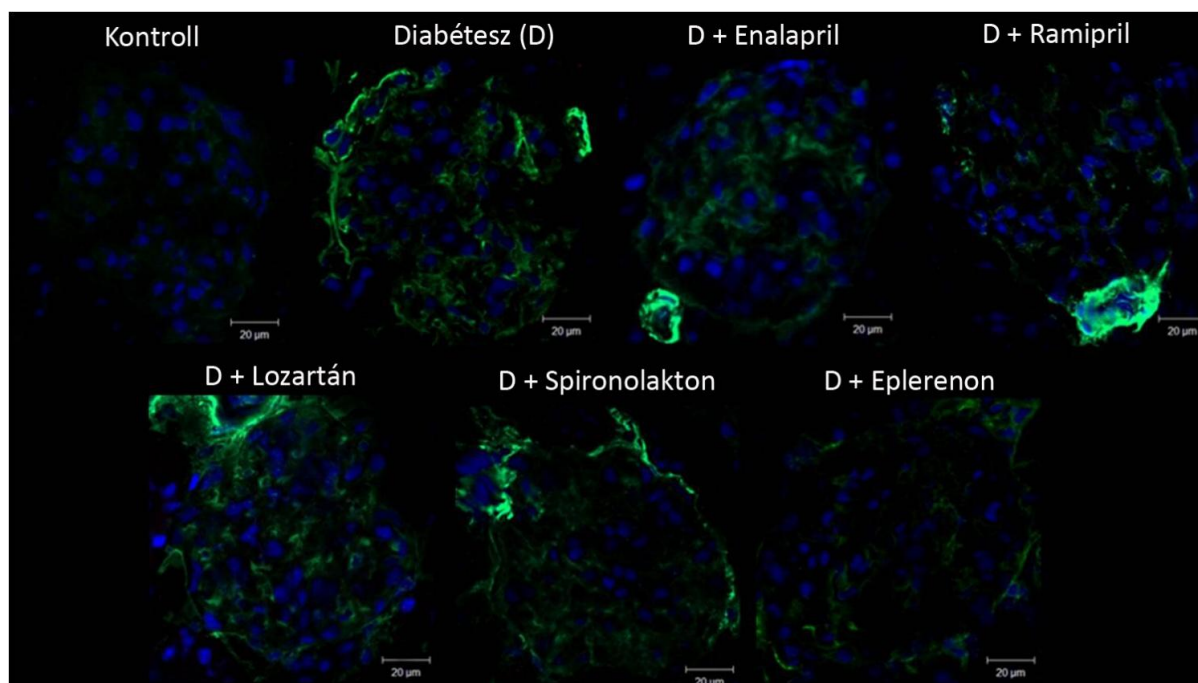


6.ábra: Hisztológia 2. PAS festett vesemetszetek kontroll (K), diabéteszes (D), enalapril, ramipril, lozartán, spironolakton vagy eplerenon kezelt patkányokból. Püspöklila színnel látható a PAS pozitív régió (fekete nyíl). A diagramm a mezangiális mátrix expanszió kvantifikált értékeit mutatja. Objektív: 40X. Lépték: 50 μ m. n=6 / csoport, *** K vs. D $p<0,0001$; ## D vs. Enalapril és Ramipril $p<0,01$; \$\$\$ D vs. Lozartán, Spironolakton és Eplerenon $p<0,0001$.

5.3 Immunhisztokémia

5.3.1 Az α SMA fehérje kifejeződése a glomerulusokban

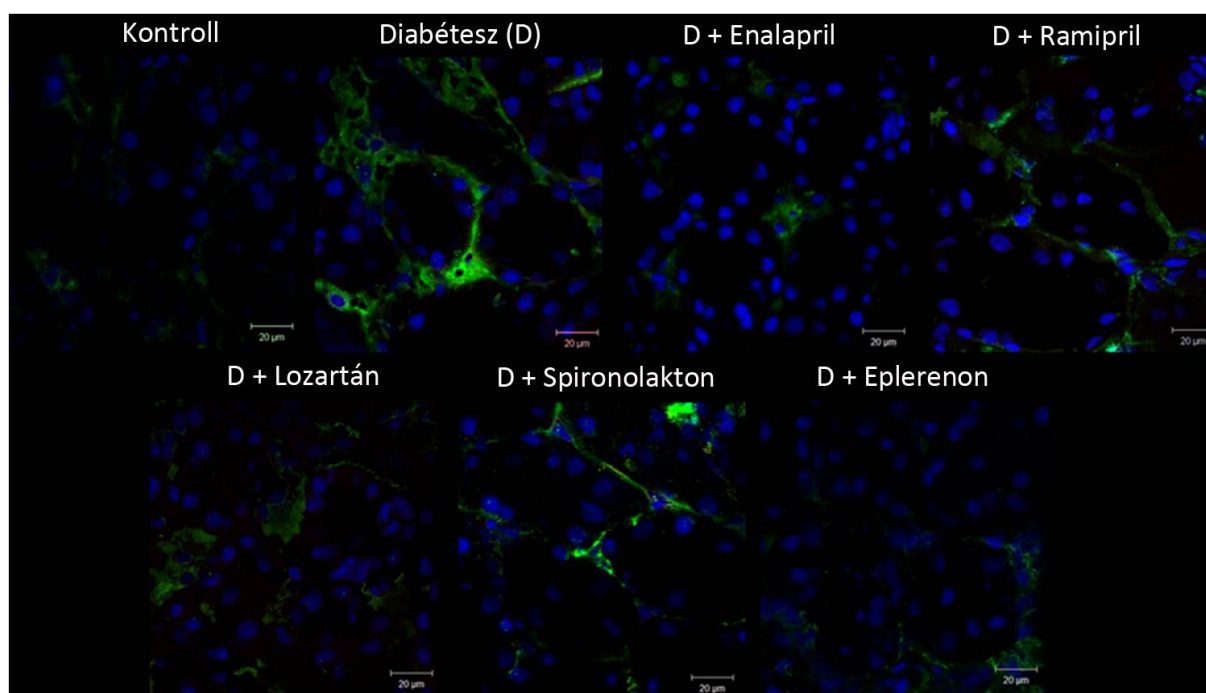
Immunhisztokémiai módszerrel követtük az α SMA lokalizációs változásait a vesében. A kontroll állatok vese glomerulusában minimális az α SMA expresszió, főleg az erek körül lokalizálódik. Ezzel szemben diabéteszben nő a fehérje mennyisége. A RAAS gátlóval kezelt állatok glomerulusaiban, valemennyivel kevesebb α SMA festődés volt észlelhető, de mivel a módszer nem alkalmas mennyiségi meghatározásra, ezért a későbbiekben a renális α SMA változását Western blottal határoztuk azt meg.



7. ábra: Immunhisztokémia 1. Kontroll (K), diabéteszes (D), enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok glomerulusainak reprezentatív immunhisztokémiai képe. Objektív: 63X. Lépték: 20 μm. Kék: sejtmag; Zöld: α -simaizom aktin (α SMA).

5.3.2 Az α SMA fehérje kifejeződése a tubulusokban

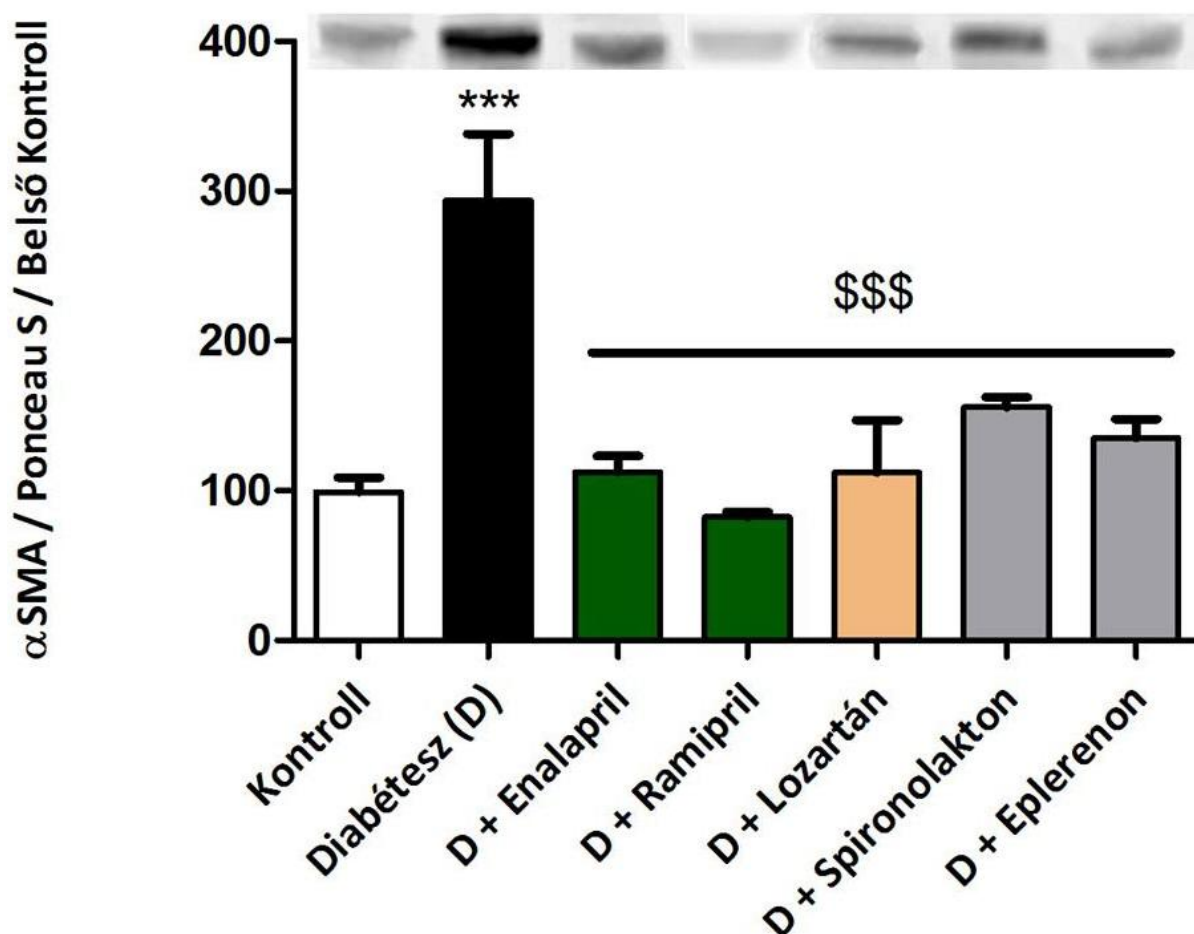
A kontroll állatból származó vesemetszeten szintén minimális az α SMA mennyisége a tubulusokban. Diabétiszben megjelenik a tubulusok falában, valamint erősebb festődés észlelhető az intersticiális térben. A RAAS gátló kezelések esetében az α SMA festődés kevésbé intenzív.



8.ábra: Immunhisztokémia 2. Kontroll (K), diabéteszes (D), enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok tubulusainak reprezentatív immunhisztokémiai képe. Objektív: 63X. Lépték: 20 μ m. Kék: sejtmag; Zöld: α -simaizom aktin (α SMA).

5.4 Western-blot analízis

A szövettani vizsgálatok alapján diabétesz hatására a DNP-re jellemző fibrotikus átalakulások indulnak be a vesében, valamint immunhisztokémiával kimutattuk az α SMA jelenlétét DM-ben. A fehérje mennyiségi változását Western-blot analízissel kvantifikáltuk. Az α SMA szintje a kontrollhoz képest megemelkedik diabéteszben, a RAAS gátló kezelések hatékonyan csökkentik az α SMA fehérje renális mennyiségét (9.ábra).



9.ábra: A renális α -simaizom aktin (α SMA) fehérje mennyiségi változása. Kontroll (K), diabéteszes (D) és enalaprillal, ramiprillel, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt patkányokból származó mintákban. Diabéteszben megemelkedett az α SMA fehérje mennyisége, amely mennyiségét minden RAAS gátló hatékonyan csökkentette. n=6/ csoport, *** K vs. D p<0,0001; \$\$\$ D vs. RAAS gátlók p<0,0001.

6. Megbeszélés

A DNP a végső stádiumú veseelégtelenségek fő okozója [90]. Jelentős életmódbeli és életminőségbeli változáson mennek keresztül a vesepótló kezelésre szoruló, végstádiumú vesebetegek [91]. A betegek személyét érintő nehézségek mellett, a krónikus vesebetegség kezelése magas költségekkel jár, mely jelentős egészségügyi és gazdasági terhet ró a társadalomra [92].

A DNP pontos patomechanizmusa még nem ismert. Az Amerikai Diabétesz Társaság (ADA), a magyarországi ajánlások és az Európai Diabétesz Szövetség szerint a RAAS gátlók kombinált terápiás alkalmazása, pontosabban ACE gátlók és ARB alkalmazása DNP-ben a javasolt és a jelenleg legelfogadottabb kezelési lehetőség [93-95].

Kísérleteinkben monoterápiában alkalmaztuk az egyes RAAS gátlókat, melyek kezelési dózisait egyrészt irodalmi adatok, másrészt pedig korábbi kísérleti eredményeink alapján határoztuk meg. Az alkalmazott RAAS gátlók mennyiségét, olyan módon állítottuk be, hogy az a kísérleti állataink vérnyomását ne csökkentsék, azaz egy non-presszor dózist határoztunk meg. Ezáltal a RAAS gátlók potenciális renoprotektív tulajdonságát vérnyomáscsökkentő hatásuktól független tudtuk vizsgálni a diabétesz indukálta vesekárosodás modelljében. A PAS illetve Masson festett metszetek egyértelműen mutatják, hogy 1-es típusú DM során a vese szöveti struktúrája károsodik. A PAS festett vesemetszeteken megfigyelhető a glomeruláris mezangium kiterjedése, amely beszűkíti a kapillárisok lumenét ezzel a filtráció hatékonyságát rontja. A perjódsav-Schiff festék a szöveti sérülés helyén kicsapódó glikogént mély lila színűre festi. Az intersticiális fibrózis mértékét Masson festett metszeteken értékeltük. A Masson festék kék színűre festi a fibrótikus szöveti területet. Masson pozitív régió normoxiás vesében a behálózó nagyobb erek falában figyelhető meg, viszont diabéteszben az intersticiális térben megemelkedik a fibrótikus szövet aránya. A RAAS gátló szerek effektíven mérsékeltek mind az intersticiális fibrózist, mind a mezangiális mátrix expansiójának mértékét.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a különböző RAAS gátlók hatékonyak az 1-es típusú DM indukálta veseszövet károsodásának megelőzésében, továbbá, ezt a jótékony hatásukat monoterápiában is kifejtik.

Az irodalom szerint a szöveti fibrózis és az EMT egyik legjobban mérhető markere az α SMA fehérje. Ez egy 42 kDa-os protein, mely a sejtek citoszkeletonjának formázásában vesz részt. Az EMT-n keresztülmenő epiteliális sejtek DNP-ben de novo α SMA-t termelnek [96].

A kontroll állatok veséjéből készült reprezentatív mintákon az α SMA csak a glomerulusok falában volt észlelhető, diabéteszben a glomerulusok belső részeiben is megjelenik. A vesetubulusok esetében pedig megfigyeltük, hogy az α SMA fehérje megjelent a tubulusok közötti térben. A monoterápiában alkalmazott RAAS gátlók hatására az α SMA szignálja gyengült. Mivel a vizualizációs technikák nem alkalmasak mennyiségi analízisre, ezért az α SMA fehérje mennyiségi változásait Western-blottal határoztuk meg az egyes kezelési csoportok között. A számszerűsített eredmények igazolják a szövettani vizsgálatok eredményeit, az összes RAAS gátló hatékonyan csökkentette az α SMA fehérje renális megjelenését.

Eredményeinkre alapozva következtethetünk arra, hogy az EMT folyamata szerepet játszhat DNP kialakulásában, melynek specifikus gátlása terápiás támpont lehet a jövőben valamint kimondhatjuk, hogy a RAAS gátlók renoprotektív hatást fejthetnek ki DNP-ban, részben az EMT kivédésén keresztül.

7. Összefoglalás

A DM egy összetett anyagcsere betegség, amely hosszútávon, a makro- és mikrovaszkuláris szövődményeket is okoz, melyek a vese funkcionális és strukturális épségét negatívan befolyásolják. A krónikus veseelégtelenség a DNP egyik vezető oka és világszerte egyre több ember szenved tőle. Krónikus veseelégtelenség kezelésére napjainkban két lehetőség van: a vese dialízis és a vese transzplantáció. Mindkét kezelés rendkívül nagy terhet ró a betegekre, hiszen életük a kezelés köré korlátozódik. Ezen kívül a probléma nagyban érinti az egészségügyet és a gazdaságot is. Jelenleg a DNP kezelése nem megoldott, pontos patogenezise nem ismert.

Ismert, hogy DNP-ben a RAAS rendszer fokozott aktivitású, ami az EMT folyamatán keresztül járulhat hozzá a vese fibrotikus átalakulásához, végsősoron a nefropátiához. Jelenleg a nemzetközi és hazai orvosi ajánlások a RAAS gátlók kombinációjának szedését javasolják a DNP kezelésére. Kísérleteink célja az volt, hogy vizsgáljuk a RAAS gátlók monoterápiában történő alkalmazásának lehetőségét a 1-es típusú DM indukálta vesekárosodás állatmodelljében.

Először vizsgáltuk a vese szöveti állapotának változását, az intersticiális fibrózis mértékének és a mezangiális mátrix expanziójának meghatározásával, RAAS gátló kezelést követően, Masson és PAS festett metszeteken. Másodszor vizsgáltuk az EMT markerének, az α SMA-nak a glomeruláris és tubuláris lokalizációs változásait. Harmadszor pedig Western-blot analízis segítségével számszerűsítettük az α SMA fehérje expressziós változásait az egyes kezelési csoportok között. Szövettani vizsgálataink bizonyították, hogy az 1-es típusú DM hatására megindul a vesék strukturális és funkcionális károsodása. Ezt a károsodást a RAAS gátlók monoterápiában mérsékeltek. Az immunhisztokémiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy DM-ben a glomerulusokban megjelenik az α SMA fehérje, RAAS gátlás hatására pedig gyengébb jeleket kaptunk. DM-ben az α SMA megjelenik a tubulusok falában és a tubulusok közti térben, ezt a RAAS gátló kezelések szintén hatékonyan mérsékeltek. A molekuláris biológiai analízis pedig megerősítette a szövettani vizsgálatok eredményét, a RAAS gátlók mérsékeltek a kezelt állatok veséjében az α SMA expresszióját.

Eredményeink arra mutatnak rá, hogy az EMT folyamata szerepet játszhat DNP kialakulásában, amely gátlása hatékony terápiás támpont lehet a jövőben, valamint a RAAS gátló kezelések részben az EMT gátlásán keresztül fejthetik ki renoprotektív hatásukat.

8. Köszönetnyilvánítás



Szeretném megköszönni **Tulassay Tivadar professzor úrnak** és **Dr. Vannay Ádámnak**, a lehetőséget, hogy a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikájának Gyermekgyógyászati- és Nefrológiai kutatólaboratóriumában dolgozhattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Hodrea Judit** témavezetőmnek, aki rendkívüli precizitással és szakmai hozzáértésével segítette munkámat és ennek a dolgozatnak a létrejöttét.

Köszönöm **Kőszegi Sándor** készségességét és önzetlen segítőkészségét, beleértve azt is, hogy akár hajnali 4 órakor is fordulhattam hozzá segítségért.

Köszönöm **Lénárt Lillának**, **Gellai Renátának** és **Hosszú Ádámnak**, hogy ők is mindig segítségemre voltak, ha megszorultam. És persze a kitűnő társaságot is köszönöm.

Köszönettel tartozom **Hermesz Edit** tanárnőnek, hogy támogatta a TDK-ra való jelentkezésemet és hogy belső konzulensként követi tudományos munkámat.

Végül, de nem utolsósorban a legnagyobb köszönet **Dr. Fekete Andreát, az MTA-SE „Lendület” Diabétesz Kutatócsoport** vezetőjét illeti. Köszönöm, hogy befogadott és biztosította a feltételeket a szakmai fejlődésemhez, valamint, hogy mindig megbízott bennem és támogatott.

9. Irodalomjegyzék

1. Társaság, M.D. <http://www.diabet.hu/betegtajekoztato.aspx>.
2. <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>.
3. Association, A.D., *Clinical practice recommendations*. Diabetes Care, 1997. **20**: p. 1-70.
4. Davies, J.L., et al., *A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes*. Nature, 1994. **371**(6493): p. 130-6.
5. Kahn, S.E., et al., *Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function*. Diabetes, 1993. **42**(11): p. 1663-72.
6. Chronic Kidney Disease Prognosis, C., et al., *Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis*. Lancet, 2010. **375**(9731): p. 2073-81.
7. Nouwen, A., et al., *Prevalence of depression in individuals with impaired glucose metabolism or undiagnosed diabetes: a systematic review and meta-analysis of the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium*. Diabetes Care, 2011. **34**(3): p. 752-62.
8. Cukierman, T., H.C. Gerstein, and J.D. Williamson, *Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies*. Diabetologia, 2005. **48**(12): p. 2460-9.
9. Low, J., et al., *The experiences of close persons caring for people with chronic kidney disease stage 5 on conservative kidney management: Contested discourses of ageing*. Health (London), 2014.
10. Avsar, U., et al., *Psychological and emotional status, and caregiver burden in caregivers of patients with peritoneal dialysis compared with caregivers of patients with renal transplantation*. Transplant Proc, 2013. **45**(3): p. 883-6.
11. Lindstrom, J., et al., *Take action to prevent diabetes--the IMAGE toolkit for the prevention of type 2 diabetes in Europe*. Horm Metab Res, 2010. **42 Suppl 1**: p. S37-55.
12. Collins, A.J., et al., *United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2012. **59**(1 Suppl 1): p. A7, e1-420.
13. Andersen, A.R., et al., *Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study*. Diabetologia, 1983. **25**(6): p. 496-501.
14. Nagy, J., Degrell, P., Wittmann, I., *A vesebiopszia indikációja cukorbetegségben*. (LAM) Lege Artis Medicinae, 2003. **13**: p. 613-619.
15. Jermendy, G., Gaál, Z., Gerő, L., Hidvégi, T., Kempler, P., Winkler, G., *A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegség kezelése és gondozása a felnőttkorban*. Diabetologia Hungarica, 2011.
16. Gero, L., *[Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy]*. Orv Hetil, 2010. **151**(13): p. 533-9.
17. Wada, J. and H. Makino, *Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Clin Sci (Lond), 2013. **124**(3): p. 139-52.
18. Társaság, M.N., *A diabéteszes nephropathia vizsgálata és kezelése*. In: MINISZTERIUM, E. (Ed.).
19. Shalamanova, L., et al., *Characterisation of the expression of the Renin-Angiotensin system in primary and immortalised human renal proximal tubular cells*. Nephron Exp Nephrol, 2010. **116**(3): p. e53-61.
20. Robbins, L., S. Kumar, Vinay, *Robbins basic pathology*. 2007.
21. Ribeiro-Oliveira, A., Jr., et al., *The renin-angiotensin system and diabetes: an update*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(4): p. 787-803.
22. Burns, K.D., *Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney*. Am J Kidney Dis, 2000. **36**(3): p. 449-67.

23. Zaman, M.A., S. Oparil, and D.A. Calhoun, *Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(8): p. 621-36.
24. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 261-71.
25. Kecskeméti, V., *Farmakológia*. Antihipertenzív szerek., ed. K. GYIRES, FÜRST, Z. 2007.
26. Ali, Q., R. Sabuhi, and T. Hussain, *High glucose up-regulates angiotensin II subtype 2 receptors via interferon regulatory factor-1 in proximal tubule epithelial cells*. Mol Cell Biochem, 2010. **344**(1-2): p. 65-71.
27. Masaki, H., et al., *Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 527-35.
28. Akishita, M., et al., *Expression of the AT2 receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth*. J Clin Invest, 1999. **103**(1): p. 63-71.
29. Hakam, A.C. and T. Hussain, *Renal angiotensin II type-2 receptors are upregulated and mediate the candesartan-induced natriuresis/diuresis in obese Zucker rats*. Hypertension, 2005. **45**(2): p. 270-5.
30. Hakam, A.C., A.H. Siddiqui, and T. Hussain, *Renal angiotensin II AT2 receptors promote natriuresis in streptozotocin-induced diabetic rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(2): p. F503-8.
31. Gaspari, T.A., et al., *Ganging up on angiotensin II type 1 receptors in vascular remodeling*. Hypertension, 2012. **60**(1): p. 17-9.
32. Remuzzi, G., A. Benigni, and A. Remuzzi, *Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 288-96.
33. Bohle, A., et al., *The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis*. Pathol Res Pract, 1990. **186**(1): p. 135-44.
34. Gesualdo, L., et al., *Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 461-70.
35. Mezzano, S.A., M. Ruiz-Ortega, and J. Egido, *Angiotensin II and renal fibrosis*. Hypertension, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 635-8.
36. Raij, L., *The pathophysiologic basis for blocking the renin-angiotensin system in hypertensive patients with renal disease*. Am J Hypertens, 2005. **18**(4 Pt 2): p. 95S-99S.
37. van Kats, J.P., et al., *Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production*. Kidney Int, 2001. **60**(6): p. 2311-7.
38. Braam, B., et al., *Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. F891-8.
39. Burnier, M. and H.R. Brunner, *Angiotensin II receptor antagonists*. Lancet, 2000. **355**(9204): p. 637-45.
40. Zhuo, J., et al., *Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors*. J Hypertens, 1998. **16**(12 Pt 2): p. 2027-37.
41. Shalamanova, L., et al., *Albumin overload induces adaptive responses in human proximal tubular cells through oxidative stress but not via angiotensin II type 1 receptor*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(6): p. F1846-57.
42. Chai, S.Y., et al., *The angiotensin IV/AT4 receptor*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(21): p. 2728-37.
43. Ardaillou, R. and D. Chansel, *Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II*. Kidney Int, 1997. **52**(6): p. 1458-68.
44. Handa, R.K., *Characterization and signaling of the AT(4) receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 440-9.
45. Li, N., et al., *The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(2): p. F353-62.
46. Lely, A.T., et al., *Renal ACE2 expression in human kidney disease*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 587-93.

47. Grobe, J.L., et al., *Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2417-23.
48. Pereira, R.M., et al., *The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7)*. J Hepatol, 2007. **46**(4): p. 674-81.
49. Rutkowski, B. and E. Krol, *Epidemiology of chronic kidney disease in central and eastern europe*. Blood Purif, 2008. **26**(4): p. 381-5.
50. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition ed. 2001: Garland Science.
51. Wyatt, C.M., et al., *The impact of hepatitis C virus coinfection on HIV-related kidney disease: a systematic review and meta-analysis*. AIDS, 2008. **22**(14): p. 1799-807.
52. Barnes, J.M., *Mode of action of some toxic substance, with social reference to the effects of prolonged exposure*. Br Med J, 1961. **2**(5260): p. 1097-104.
53. Grande, M.T., F. Perez-Barriocanal, and J.M. Lopez-Novoa, *Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 19.
54. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
55. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
56. Rothenpieler, U.W. and G.R. Dressler, *Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development*. Development, 1993. **119**(3): p. 711-20.
57. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 952-61.
58. Kim, K.K., et al., *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13180-5.
59. Zeisberg, M., et al., *Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23337-47.
60. Mucsi, I. and L. Rosivall, *Epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells in the pathogenesis of progressive tubulo-interstitial fibrosis*. Acta Physiol Hung, 2007. **94**(1-2): p. 117-31.
61. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Acta Anat (Basel), 1995. **154**(1): p. 8-20.
62. Turley, E.A., et al., *Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression?* Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(5): p. 280-90.
63. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
64. Boyer, B., A.M. Valles, and N. Edme, *Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(8): p. 1091-9.
65. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
66. Tsai, R.Y., R. Kittappa, and R.D. McKay, *Plasticity, niches, and the use of stem cells*. Dev Cell, 2002. **2**(6): p. 707-12.
67. 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.
68. Yang, J. and Y. Liu, *Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1465-75.
69. Strutz, F., et al., *Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation*. Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1714-28.
70. Kalluri, R., *EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1417-9.
71. Liu, Y., *New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(2): p. 212-22.
72. <http://www.leicabiosystems.com/>. Novocastra SMA (Alpha Smooth Muscle Actin).

73. Vandekerckhove, J. and K. Weber, *Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins*. Eur J Biochem, 1981. **113**(3): p. 595-603.
74. Mounier, N., et al., *Transfected muscle and non-muscle actins are differentially sorted by cultured smooth muscle and non-muscle cells*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 7)**: p. 839-46.
75. Masszi, A., et al., *Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(5): p. F911-24.
76. Liu, Y., *Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(1): p. 1-12.
77. Arce, L., N.N. Yokoyama, and M.L. Waterman, *Diversity of LEF/TCF action in development and disease*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7492-504.
78. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
79. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
80. Venkov, C.D., et al., *A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2007. **117**(2): p. 482-91.
81. Yang, J. and Y. Liu, *Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 96-107.
82. Zeisberg, M. and R. Kalluri, *Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease*. Pediatr Nephrol, 2008. **23**(9): p. 1395-8.
83. Liu, Y., *Hepatocyte growth factor and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(1): p. 23-30.
84. Klahr, S., *The bone morphogenetic proteins (BMPs). Their role in renal fibrosis and renal function*. J Nephrol, 2003. **16**(2): p. 179-85.
85. Kurtz, T.W., et al., *Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. e22-33.
86. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/conektv/masson.htm>.
87. http://en.wikipedia.org/wiki/Masson's_trichrome_stain.
88. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/schiff/reaction-pas.htm>.
89. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/schiff/pas-standard.htm>.
90. Gilbertson, D.T., et al., *Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(12): p. 3736-41.
91. Willingham, F., *The dietary management of patients with diabetes and renal disease: challenges and practicalities*. J Ren Care, 2012. **38 Suppl 1**: p. 40-51.
92. Lei, C.C., et al., *Educational intervention in CKD retards disease progression and reduces medical costs for patients with stage 5 CKD*. Ren Fail, 2013. **35**(1): p. 9-16.
93. Harris, K.P., *The implications of the renal NSF for diabetologists*. Diabet Med, 2006. **23 Suppl 3**: p. 13-5.
94. Jermendy, G., Gaál, Z., Gerő, L., Hidvégi, T., Kempler, P., Winkler, G., *A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegség kezelése és gondozása a felnőttkorban. A Magyar Diabétesz Társaság szakmai irányelve*. 2011.
95. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2013*. Diabetes Care, 2013. **36 Suppl 1**: p. S11-66.
96. Galichon, P. and A. Hertig, *Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside?* Fibrogenesis Tissue Repair, 2011. **4**: p. 11.

10. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Szkibinszkij Edgár a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül részt vettem a:

1. Kísérleti állatok kezelésében (gyógyszeradagolás, vércukorszint mérés)
2. Kísérleti állatokból történő mintavételben (állatok altatása vese kiműtése)
3. Vérnyomásmérés
4. A PAS és Masson festett metszetek fénymikroszkóppal történő fotózásában, majd a képek számítógépes kiértékelésében (a dolgozatban szereplő képek saját készítésűek)
5. Immunhisztokémia (vese metszetek festése)
6. Western-blot analízisben (a teljes folyamatot önállóan végeztem)

.....

aláírás

Szeged, 2014. június 19.