

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2448.**

**BUKOSZA ÉVA NÓRA**

**A folyadék- és elektrolitháztartás szabályozásának élet- és kóréletana**  
**-Keringés és vérnyomás szabályozás**  
című program

Témavezetők: Dr. Hamar Péter, egyetemi tanár

Dr. Szénási Gábor, tudományos főmunkatárs

Programvezető: Dr. Rosivall László, egyetemi tanár

# A glomeruloszklerózis korai és késői szakaszának vizsgálata rágcsálókban

Doktori értekezés

**Dr. Bukosza Éva Nóra**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Hamar Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár  
Dr. Szénási Gábor, C.Sc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Haris Ágnes Ph.D., osztályvezető főorvos  
Dr. Pap Domonkos Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Losonczy György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Rempört Ádám, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Micsik Tamás Ph.D., klinikai szakorvos

Budapest  
2020

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	5
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. A kutatási témaválasztás bevezetése.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. A krónikus vesebetegség (CKD) jelentősége, epidemiológiája, okai .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. A glomerulonefritisek (GN) és a fokális szegmentális glomeruloszklerózis .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. A fokális szegmentális glomeruloszklerózis morfológiája .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. A fokális szegmentális glomeruloszklerózis patomechanizmusa .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Glomerulopátia rágcsáló modellek .....</b>	<b>16</b>
<b>1.7. Az extracelluláris mátrix összetétele egészségben és betegségben .....</b>	<b>17</b>
<b>1.8. Komplement rendszer CKD-ben.....</b>	<b>18</b>
<b>1.9. Obezitás és zsíretetéssel indukált rágcsáló modellek: zsírszöveti átépülés szerepe a szisztémás gyulladásban és a vesében.....</b>	<b>22</b>
<b>1.10. Ismereteink a Long Evans patkány nefropátiáról más modellekben.....</b>	<b>23</b>
<b>1.11. A megváltozott lipid anyagcsere szerepe CKD-ben .....</b>	<b>24</b>
<b>1.12. Az elhízás paradoxon .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Obezitás és prediabétesz korai vesehatásainak vizsgálata patkányban... 29</b>	<b>29</b>
3.1.1. Obez, prediabéteszes Long Evans patkány modell .....	29
3.1.2. Vese és más szöveti minta gyűjtés .....	29
3.1.3. Funkcionális vese paraméterek .....	30
3.1.4. Génexpressziós vizsgálatok vese és zsírszöveti mintákon .....	31
3.1.4.1. RNS preparálás.....	31
3.1.4.2. Kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative Real-Time PCR) vizsgálat .....	31
3.1.4.3. Fehérje-kódoló, hírvivő mRNS (messenger RNS) mérések.....	32
3.1.4.4. MikroRNS-szint mérések .....	35
<b>3.2. FSGS késői stádiumának vizsgálata transzgenikus egérben .....</b>	<b>35</b>
3.2.1. A miR-193a-indukált transzgenikus egér modell.....	35
3.2.2. Egér vese glomerulus és ECM izolálás.....	36

3.2.3.	Glomeruláris ECM előkészítése tömegspektrometriai analízisre .....	36
3.2.4.	Nano-HPLC/Hybrid Quadrupole–Orbitrap Tömegspektrometria .....	37
3.2.5.	LC-MS adat feldolgozás fehérje azonosítás és kvantifikáció.....	37
3.2.6.	MRNS adatelemzés egér és humán FSGS glomeruláris mintákon .....	38
<b>3.3.</b>	<b>Hisztomorfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok egér és patkány vese mintákon.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.</b>	<b>Statisztikai módszerek .....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Eredmények .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.</b>	<b>Az obez, prediabéteszes Long-Evans patkány, mint korai ORG modell. 41</b>	
4.1.1.	A HFD-STZ indukált Long-Evans patkányokban az elhízás, a prediabétesz és a zsírszöveti átépülés ellenére a májfunkció megtartott maradt ....	41
4.1.2.	Az obez, prediabéteszes patkányokban megtartott vesefunkció mellett szignifikáns kollagén lerakódás és tubuláris Lcn2 expresszió jelent meg .....	44
4.1.3.	A vesefibrózis ismert mRNS és miRNS markere nem változtak a PRED patkányokban .....	48
4.1.4.	A gyulladás, oxidatív stressz és metabolizmus markereinek mRNS expressziója obez, prediabéteszes patkányok veséiben változatlan.....	49
<b>4.2.</b>	<b>A glomeruláris ECM összetétele miR-193a-indukált késői FSGS-ben .... 51</b>	
4.2.1.	Előrehaladott FSGS morfológiai és funkcionális jelei 8-hetes miR-193a-indukciót követően.....	51
4.2.2.	Akut fázis válasz, komplement alkotók, fibrinogén és szerin proteázok	51
4.2.3.	További FSGS-ben potenciálisan releváns ECM-gének egér-humán RNS-szintű összehasonlítás alapján .....	57
<b>5.</b>	<b>Megbeszélés.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.</b>	<b>Obezitás, prediabétesz okozta korai nefropátia patkányban .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2.</b>	<b>A glomeruláris ECM összetétele előrehaladott, miR-193a-indukált egér FSGS-ben.....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Következtetések.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>78</b>
<b>10.</b>	<b>Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>112</b>

<b>10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk: .....</b>	<b>112</b>
10.1.1. Első szerzős .....	112
<b>10.2. A disszertációtól független közlemények: .....</b>	<b>112</b>
10.2.1. Megosztott első szerzős .....	112
10.2.2. Társszerzős közlemények .....	112
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>115</b>

**Rövidítések jegyzéke**

AAV	ANCA asszociált-vaszkulitisz
ACE2	angiotenzin konvertáló enzim 2
Adpn	adiponektin
AGC	automatikus nyereség (gain) kontrol
AGTR1	angiotenzin II 1-es típusú receptor
$\alpha$ SMA	alfa simaizom aktin
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
ANCA	anti-neutrofil citoplazmatikus antigén
APOA1	apolipoprotein A1
ATMs	adipose tissue macrophages, monocita eredetű makrofágok
BC	Bowman-tok
BMP	bone morphogenetic protein, csont morfogénikus fehérje
CFP	properdin
CKD	krónikus vesebetegség
Colla1	kollagén I
COL12A1	kollagén XII típus, alpha-1 lánc
COL3A1	kollagén III típus, alpha-1 lánc
CRP	C-reaktív fehérje
C1R	komplement C1r
C1q	komplement C1q
C3	komplement C3
C3GN	C3 glomerulopátia
C4B	komplement C4-B
DAF	decay-accelerating faktor
DDA	data-dependent acquisition, adatfüggő adatgyűjtés
DDD	dense deposit disease, az alapmembrában Ig lerakódással járó betegség
DN	diabéteszes nefropátia
DTT	dithiotreitol, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol
ECM	extracelluláris mátrix
EM	elektronmikroszkópia
ER	endoplazmatikus retikulum
eGFR	(estimated) becsült glomeruláris filtrációs ráta
eNOS	endoteliális NO-szintáz
epidAT	epididmális zsírszövet
ESRD	végstádiumú vesebetegség
FABP-3	fatty acid binding protein 3, zsírsavkötő fehérje 3
FFAs	free fatty acids, szabad zsírsavak
FGA, FGB, FGG	fibrinogén $\alpha$ , $\beta$ és $\gamma$ láncok
FM	fénymikroszkópia
FN	fibronektin

FSGS	fokális szegmentális glomeruloszklerózis
Gapdh	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GBM	glomeruláris alap (bazális) membrán
GEN	glomeruláris endotél sejtek
GN	glomerulonefritisz
GWAS	genom-wide association study, genom-szintű analízis
HBA1	$\alpha$ -globin
HBB-B1	$\beta$ 1-globin
HBB-B2	$\beta$ 2-globin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, Hank-féle egyensúlyi sóoldat (pufferoldat)
HCD	high energy collision dissociation, magas energiájú kollíziós szétesés
HDGFL3, HRP3	Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein 3, hepatómából származó növekedési factor fehérje 3
HDL	high-density lipoprotein, magas denzitású lipoprotein
HPLC-MS	high-performance liquid chromatography mass spectrometry, nagy teljesítményű folyadék kromatográfias tömegspektrometria
HUS	hemolitikus urémiás szindróma
IgA, IgM	immunglobulin A, -M
IGF	inzulin-szerű növekedési faktor
IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1; inzulin-szerű növekedési factor kötő fehérje 1
IL-1 $\beta$	interleukin-1 béta
IL-6	interleukin-6
ingWAT	lágyéki, fehér zsírszövet
ITIH1	inter-alfa-tripszin gátló nehézlánc H1
LEA	Long-Evans Agouti patkány
LEC	Long-Evans Cinnamon patkány
LETO	Long Evans Tokushima Otsuka patkány
Ob-Ra	leptin receptor rövid formája
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty patkány
ORG	obesity-related glomerulopathy, elhízással összefüggő glomerulopátia
MAC	membrane attack complex, membránkárosító komplex
MCD	minimal change disease
MCP, CD46	membrán kofaktor fehérje
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1, monocita kemoattraktáns fehérje 1
MMP	mátrix metalloproteinázok
MS	tömegspektrometria
NCE	normalizált kollíziós energia
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B; sejtmagi faktor $\kappa$ B
NGAL	neutrofil-zselatináz asszociált lipokalin (Lcn2)

Nrf2 vagy NFE2L2	nukleáris faktor (eritroid-eredetű 2) -szerű 2
PAN	puromicin aminonukleozid nefropátia
PAS	perjódsav-Schiff
PECs	parietal epithelial cells, parietális epitél sejtek
PIGR	polimer immunoglobulin receptor
PPAR $\gamma$	PPAR-gamma
PPT1	palmitoyl-protein tioészteráz 1
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz lánc reakció
RNA	ribonukleinsav
rno	<i>Rattus norvegicus</i> , a laboratóriumi patkány faj neve
ROS	reaktív oxigén gyökök
RRT	renal replacement therapy, vesepótló kezelés
SFOG	savas fukszin narancs G
SNP	single nucleotid polymorphism, egy nukleotid polimorfizmus
TAFI	trombin-aktivált fibrinolízis gátlószer
TFA	trifluoro acetic acid, trifluoro-ecetsav
TGF- $\beta$ 1	transzformáló növekedési faktor beta 1
TNF $\alpha$	tumor nekrozis faktor-alfa
TIMP	szöveti metalloproteináz gátlók
TLR4	Toll-like receptor 4
SERPINA1	szerin proteináz A1
SERPINA3	szerin proteináz A3
SFTPD	pulmonary surfactant-associated protein D
SOST	szklerosztin
SREBP-1	sterol regulatory element binding protein 1, szterol szabályozó elem-kötő fehérje 1
SPP1	oszteopontin
suPAR	szolubilis urokináz plazminogén aktivátor receptor
ttkg	kg testsúly
TINAG	tubulointersticiális nefritisz antigén
TMA	trombotikus mikroangiopátia
TTP	trombotikus trombocitopéniás purpura
UMOD	uromodulin, Tamm-Horsfall fehérje
VAT	visceral adipose tissue, vizcerális vagy zsigeri zsírszövet
VCI	vena cava inferior
VEGFA	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor-alfa
WT1	Wilms' tumor 1



## 1. Bevezetés

### 1.1. A kutatási témaválasztás bevezetése

A **krónikus vesebetegség (CKD)** a világ népességének 10%-át érintő globális probléma, amely súlyos egészségügyi és gazdasági terhet ró a társadalmakra (Jha és mtsai., 2013). A CKD hátterében állhat elsődleges vagy másodlagos glomeruláris betegség, de lehet késői következménye az akut iszkémiás károsodásnak, amely főleg a tubulointersticiális szöveteket érinti vagy a teljes szervezetet érintő szepszisnek. A CKD-t okozó glomeruláris betegségek általában a kórokra (illetve a klinikai gyakorlatban leggyakrabban megjelenő többszörös etiológiára) jellemző ütemű progresszióval, nefrotikus szintű fehérjevizeléssel járó végstádiumú vesebetegségig (ESRD) progrediálnak. Az ESRD kizárólag költséges és/vagy súlyos szövődmények kockázatával járó (pl.dialízis alatti hipotenzió, szívizom stunning, malignus aritmiák, kanül- vagy hashártya szepszis) (Morfin és mtsai., 2016) vesepótló kezeléssel (hemodialízis/peritoneális dialízis) tartható szinten, hosszabb távú túlélést pedig csak a szintén személyes és anyagi áldozatokkal járó veseátültetés és annak utókezelése jelenti. Ráadásul a transzplantációt követően a vesebetegség gyakran visszatérhet. Specifikus ESRD kezelést napjainkig nem ismerünk (Elshahat és mtsai., 2020).

Klinikai szempontból a **fokális szegmentális glomeruloszklerózis (FSGS)** egy heterogén etiológiájú, általános diagnosztikai jellemzőkkel leírható glomeruláris betegségcsoport (Fogo, 2015; Jefferson & Shankland, 2014). A patomechanizmusáról ismert, hogy kialakulását genetikai tényezők, keringő faktor(ok) és/vagy mechanikus stresszel okozott, elsődleges podocita károsodás okozhatja, mert a podociták, mint végdifferenciált epiteliális sejtek regenerációs képessége korlátozott. Előrehaladott stádiumban a glomerulust alkotó többi sejttípus is egyre inkább érintetté válik, és az extracelluláris mátrix (ECM) felszaporodása miatt az FSGS gyorsan progrediál. Az FSGS betegek egy része glükokortikoszteroidokra, kalcineurin-inhibitorokra (ciklosporin, takrolimusz), immunszuppresszív (ciklofoszfamid) és moduláló terápiákra (rituximab, mikofenolát-mofetil, plazmaferezis) jól reagál, mások azonban ezekre a terápiás beavatkozásokra rezisztensek, és náluk kialakul az ESRD. Tekintettel a súlyos egyéni és gazdasági terhekre, az FSGS tanulmányozása napjainkban is a kísérletes és klinikai nefrológia érdeklődésének egyik célpontja. Az FSGS patomechanizmusának kutatási eredményeitől nem csupán elméleti haszon, hanem a jövőben eredményesebb,

költséghatékonyabb terápiák fejlesztése, a vesepótló kezelés szövődményeinek elkerülése, és a betegek számára hosszabb, jobb életminőségű túlélés remélhető.

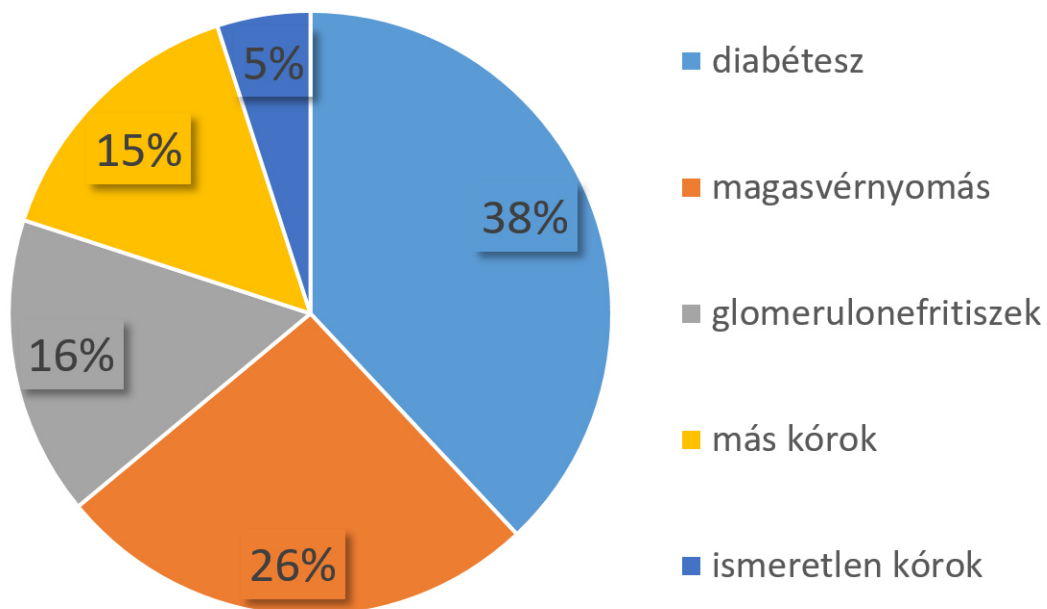
**PhD munkám során a glomerulopátiák alapvető folyamatait két különböző állatkísérletes modellen vizsgáltam.** (1) Long Evans patkányban holisztikus megközelítésben vizsgáltam az elhízás és a prediabétesz hatásait a vesében. A következményes, de nem súlyos szervi károsodások (diasztolés szívelégtelenség, zsírmáj, zsírszöveti átépülés) mellett meglepően enyhének észlelt korai vesekárosodásra utaló eredmények ismertetését más zsíretetéssel létrehozott rágcsáló modellek, illetve kifejezetten a Long Evans törzsszel kapcsolatban szerzett, a szakirodalomban elérhető korábbi tapasztalatok és általában a megváltozott lipid biológia CKD-ben tetten érhető szerepének bemutatásával vezetem be. (2) A genetikai eredetű podocita károsodás miR-193a-túlexpresszázó transzgénikus egér modelljén az FSGS már előrehaladott stádiumában a glomeruláris génexpressziós mintázat és az ECM összetételének fehérje szintű elemzésével új, az FSGS patomechanizmusában potenciálisan fontos ECM géneket kerestem. A munkához elengedhetetlen volt más, glomerulopátiákat vizsgáló rágcsáló modellek, az ECM összetételéről az irodalomban eddig összegyűlt ismeretek, valamint a komplement rendszer CKD-ben betöltött szerepének megismerése, amelyet az későbbiekben részletezek.

## **1.2. A krónikus vesebetegség (CKD) jelentősége, epidemiológiája, okai**

Globális statisztikai adatok alapján a CKD a 16. leggyakoribb halálok volt 2016-ban, de becslések szerint 2040-re akár az 5. helyre léphet elő (Foreman és mtsai., 2018). A CKD definíció szerint olyan strukturális vagy funkcionális vesekárosodás, amely több, mint 3 hónapon át fennáll (Foreman és mtsai., 2018). Figyelembe véve a szükséges kórházi kezelések megnövekedett számát, a termelésből való kiesést/a munkahelyről való távollétet, magát a betegséget és a korai halálozást, a CKD jelentős megterheléssel jár a beteg egyénre, az egészségügyi ellátórendszerre illetve a társadalomra nézve. A CKD-hez vezető leggyakoribb okok között a cukorbetegség (Alicic és mtsai., 2017), a magasvérnyomás-betegség, a glomerulonefritiszek (a glomerulus gyulladós betegségei), illetve az autoszomális domináns policisztás vesebetegség (Foreman és mtsai., 2018), míg ritkább kórokként a vese egyéb részeit érintő gyulladós megbetegedések (tubulointersticiális nefritiszek, ismételt vesemedence gyulladás) és egyes kóros vizelet elvezetőrendszeri elváltozások (veziko-ureterális reflux, elfolyási

akadályt okozó vesekövesség, prosztatata megnagyobbodás, vesedaganat) említhetők. Sok beteg esetében azonban nem azonosítható egyértelmű kórok (**1. ábra**).

A CKD diagnózisa kóros vizelet üledék eltéréseken és/vagy patológiás vese és vizeletelvezető rendszeri morfológián és a glomeruláris filtrációs ráta becslésén (eGFR) alapul. Az 1-5 terjedő stádium beosztás legsúlyosabbika az 5. stádiumú CKD, amennyiben az eGFR  $<15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , ami ESRD-nek felel meg (Jha és mtsai., 2013). Azonban a visszafordíthatatlan és progresszív CKD betegeknek csak a várhatónál kisebb része, mindössze 5%-a jut el a vesepótló (renal replacement therapy, RRT) kezelést igénylő ESRD stádiumig, aminek a hátterében a súlyos társbetegségekkel magyarázható korai halálozás áll. Egy vizsgálatban a végstádium elérését megelőzően elhunytak körében a pangásos szívelégtelenség, koszorúér betegség, a diabétesz és az anémia előfordulását szignifikánsan gyakoribbnak találták, a vérnyomás viszont nem függött össze a prognózissal (Keith és mtsai., 2004). A vesepótló kezelés lehet fenntartó hemo- vagy peritoneális dialízis illetve veseátültetés. Azonban az ESRD-hez vezető kórokok egy része, így a primer glomerulonefritiszek (GN) közé sorolható fokális szegmentális glomeruloszklerózis a transzplantált graft vesében visszatérhet (Verani & Hawkins, 1986).



**1. ábra.** A krónikus vesebetegség hátterében álló leggyakoribb kórok. Átvéve, módosítva: <https://www.cdc.gov/kidneydisease/images/publications-resources/Reported-Cause-of-End-stage.jpg> Forrás: US Renal Data System n= 726 331 (minden életkor, 2016; a policisztás vesebetegséget is tartalmazza)

### 1.3. A glomerulonefritiszek (GN) és a fokális szegmentális glomeruloszklerózis

A CKD-hez vezető leggyakoribb kórokok közt említett GN-ek eredetük szerint elsődleges és más, a szervezet egészét érintő kórképek részjelenségeként észlelt alcsoportokra oszthatók. Utóbbi csoportot **másodlagos GN**-eknek nevezzük, amely magában foglalja a szisztémás autoimmun betegség (pl. lupusz) részeként kialakuló GN-t, valamint a diabéteszes nefropátiát (DN) és az elhízással összefüggő vesebetegséget is. Másfelől noha az elhízás és a diabétesz populációs szinten világszerte jelentős és robbanásszerűen növekvő előfordulással bír, az ezekkel összefüggő vesebetegség vesebiopsziás anyagban csak töredékében jelenik meg, mivel a diagnózis alkotáshoz és a kezeléshez a szövettani eredmény nem feltétlenül szükséges, így a klinikus döntése alapján a kockázatokkal is járó beavatkozás elkerülhető. Ebből adódik, hogy a klinikai gyakorlatban elvégzett vesebiopsziák diagnózisai közt a leggyakoribbnak a másodlagos GN-ek egyike, a lupusz nefritisz adódik, mivel ennek terápójához a szövettani diagnózis elengedhetetlen.

A világ egyes országaiban különböző arányban előforduló **elsődleges GN-ek** között a szövettani megjelenés alapján leggyakoribb diagnózisként az FSGS, az IgA nefropátia, a "minimális elváltozás" betegség (minimal change disease; MCD), a membranózus GN, illetve a ritkább mezangioproliferatív GN, a membranoproliferatív GN, a félholdas (crescentikus) GN és a fokális globális szklerózis említhetők meg. Egyes eredmények alapján az FSGS előfordulása meghaladhatja a 37%-ot a vesebiopsziás anyagokban az USA-ban (Dragovic és mtsai., 2005), ugyanakkor kisebb régiók adatai alapján 17-22% körül van (Murugapandian és mtsai., 2016; Swaminathan és mtsai., 2006), míg a legutóbbi közlemények szerint Európában 11-12% körülre tehető (Arapović és mtsai., 2020; Covic és mtsai., 2006; Dunn, 2016; Zaza és mtsai., 2013). Egy 2019-ben megjelent, a világ 20 országának elmúlt 4 évtizedre visszatekintő vesebiopsziás anyagából készült összehasonlító vizsgálat az FSGS egyre növekvő előfordulását mutatja világszerte (Woo és mtsai., 2019). A megfigyelések szerint a membranózus GN és az FSGS egyre nagyobb arányú előfordulásért a fejlett országokban az urbanizáció és más szocio-ökonómiai változások tehetők felelőssé, amelyhez a megváltozott életmóddal kapcsolatos környezeti és ipari allergének, valamint étrendi elemek jelentős tényezőként járulhatnak hozzá. Ezzel egy időben más GN-ek előfordulása, például a parazitás és más fertőző betegségnek való kitettség csökkenésével párhuzamosan változik (Woo és mtsai., 2019).

Az FSGS nem egy specifikus glomeruláris betegség, hanem a vese sérülését leíró hisztomorfológiai mintázat, ami fénymikroszkópos (FM) vizsgálattal a vesebiopszián fokális (az azonosítható glomerulusok <50%-a érintett) és szegmentális (a glomeruláris érgomolyag <50%-a érintett) szklerózissal (fibrózissal, hegesedéssel) jellemezhető. A Columbia klasszifikáció specifikus kóros FM-s jelek alapján tip-lézió, celluláris, collapsing (összeomló), perihiláris és nem besorolt egyéb csoportokat határozott meg, ami diagnosztikus és prognosztikai jelentőséggel bírhat (D'Agati és mtsai., 2004).

#### **1.4. A fokális szegmentális glomeruloszklerózis morfológiája**

Az FSGS kialakulására jellemző ultrastrukturális és FM-os szövettani változások egymást követő lépéseit hasonlóképpen lehet követni az állatkísérletekben megfigyelt és részletesen leírt (W Kriz és mtsai., 1994; LeHir & Kriz, 2007) és a humán FSGS-ből származó biopsziás anyagon (Verani & Hawkins, 1986). Az FSGS kialakulásának megfigyelése a klinikumban a legnagyobb jelentőséggel a veseátültetést követően bír, mivel az esetek 15-30%-ában az FSGS visszatérésére kell számítani (D'Agati és mtsai., 2011), amelyre az elektronmikroszkópos (EM) jelek már hetekkel, de akár hónapokkal a FM-al észlelhető elváltozások kialakulása előtt figyelmeztetnek. Az FSGS kezdőpontja a podocita sérülése, amelyet EM-on a sejtestest tónusvesztése, a lábnyúlványok leválása, pszeudociszta képződés és a mikroboholy átalakulása jellemez. A podocita tartós károsodása esetén a sejthalál és az alapmembránról való sejtleválás csökkenti a podociták számát, ezáltal a glomeruláris bazális membrán (GBM) felszíne és a podociták általi lefedettsége között aránytalanság alakul ki. A fedetlenül maradt GBM-el bíró kapilláris hurok – vélhetően a podociták szerkezeti támasztásának hiánya miatt – a Bowman-tok (BC) felé úszik (balloning), ahol korai kapcsolat (sejthíd) alakul ki a tokot bélelő parietális epitél sejtekkel (PECs). Ezek a sejthidat képező sejtek ECM termeléssel fibrózus kapcsolatot alakítanak ki a sérült glomerulus és a Bowman-tok között (tuft adhézió), ami az FSGS első FM-al észlelhető jele. Noha a parietális sejtek pótolják a GBM fedettségét, a parietális epitéliumban időközben lyukak keletkeznek, ami lehetővé teszi a kóros szűrletképződést. A téves irányú filtráció miatt a parietális sejtek a Bowman-tok alapmembránjáról leszakadnak, fehérjetartalmú pszeudocrescent képződik, a filtrátum peritubuláris szétterjedése pedig tubuláris atrófiát eredményez. A rögzült kapilláris hurokban fehérje tartalmú anyag halmozódik fel, a kapilláris lumenben lipiddel kitöltött makrofágok (foam cells, magyarul habos sejtek) jelennek meg és ECM

termelődés-lerakódás kezdődik. Végül a kapilláris hurok elzáródik, ez adja a szegmentális szklerózis jellemző képét (utalok az ismertetett folyamatról olvasható összefoglaló közleményre (Jefferson & Shankland, 2014)).

### **1.5. A fokális szegmentális glomeruloszklerózis patomechanizmusa**

A klasszikus interpretáció szerint az FSGS egy podocita veszteséssel meghatározott kórállapot. Az FSGS patomechanizmusának kétségtelenül legkorábbi eseménye a podocita károsodás, azonban napjainkban a hangsúly inkább a betegség kórlefolását, a glomeruloszklerózis progresszióját meghatározó többi glomeruláris sejtípus és más struktúrák szerepére helyeződik.

Transzgenikus állatmodelleken nyert eredmények alapján ismeretes, hogy a podociták 20%-ának elvesztése még tolerálható, az e feletti veszteség azonban a hiány mértékével arányos súlyosságú, illetve ütemű FSGS progresszióhoz vezet (Y. H. Kim és mtsai., 2001; Matsusaka és mtsai., 2005; Wharram és mtsai., 2005). A podocita sérülés a szomszédos sejtre is áttevődhet (Matsusaka és mtsai., 2011), amelyet egyes esetekben angiotenzin II szintézis vagy angiotenzin II 1-es típusú receptor (AGTR1) gátlás képes megakadályozni (Fukuda, Wickman, és mtsai., 2012).

A podocita sérüléséhez számos alapvetően genetikailag meghatározott és szerzett tényező vezethet. Az FSGS-hez vezető *genetikai eltérések* legtöbbször a podocita alakját és funkcióját alapvetően meghatározó, dinamikus egyensúlyban lévő ún. strukturális fehérjéket kódoló géneket érintik. Ismertek a résdiafragma (nefrin, podocin, CD2AP, TRPC6, GLEPP1, MYO1E), az aktin sejtváza ( $\alpha$ -aktinin 4, formin, miozin IIA, ARHGAP24, ARHGDI,  $\beta$ -PIX), valamint a podocita lábnyúlványok és a GBM kapcsolatát meghatározó (LAMB2, ITGA3) géneket érintő mutációk. A résdiafragma fehérjék eltérései gyakran már az egyedfejlődés korai fázisában megnyilvánulnak vagy korai megjelenésű betegséget okoznak, ezzel szemben az aktin sejtváza rendellenességei jellemzően felnőttkorban, vélhetően egy, a podocitát érő további inzultust követően kezdenek kifejlődni. A legtöbb öröklődő podocita-betegség rezisztens immunszuppressziós terápiára (Rood és mtsai., 2012). A *szerzett tényezők* közt egy *keringő faktor* szerepét feltételezik, amelyre az elmúlt évtizedek kutatásai alapján a solubilis urokináz plazminogén aktivátor receptor (suPAR) a legvalószínűbb jelölt, bár az suPAR emelkedett plazma szintjét FSGS betegek körében végzett kutatások nem erősítették meg egyhangúan (Jefferson & Alpers, 2013). A szerzett tényezők közt a

hiperglikémia, az inzulin jelátvitel, angiotenzin II, kalcium jelátvitel, vírusfertőzések, toxinok, oxidánsok és immunológiai károsodás szerepét az irodalom részletesen tárgyalja.

Külön említésre érdemes a *mechanikai stressz*, mint a podocitákat érő károsító tényező, különös tekintettel az általunk is vizsgált elhízással indukált vesebetegség patkány modellre. A glomeruláris kapillárist érő, a podocitákra is áttevődő hemodinamikai erőkkel szemben a podocita aktin sejtváza áll ellen. Számos glomerulomegáliával járó állapotban, mint a magasvérnyomás-betegség, az elhízás, és az alacsony születési súlyú egyének esetében a fiziológiásnál kisebb nefronsám miatt kórosan fokozott szűrletképződés terheli a glomerulust, ami a renin-angiotenzin rendszer farmakológiai gátlásával kontrollálható progresszív glomerulus károsodás irányában hat (B. M. Brenner, 1985). A renin-angiotenzin rendszer aktivációjához a podociták mechanikai megnyúlása vezet, amely krónikus magas vérnyomással járó állapotokban passzívan, illetve a glomerulomegália esetén a megnövekedett GBM felszín lefedése érdekében adaptív válaszként jön létre. Az érett podociták terminálisan differenciált epitelsejtek, és közismerten rendkívül szűk proliferációs képességgel bírnak, ami legalább részben bizonyos ciklin-függő kináz inhibitorok folytonos kifejeződésének tulajdonítható (Shankland, 2006). A GBM felszín megfelelő lefedettségére törekvő podociták egyetlen lehetséges védőmechanizmusa a hipertrófia. A hipertrófia az osztódáshoz hasonlóan az aktin sejtváza újrendeződését igényli, amely a podocita alapmembránról való lesodródásnak vagy mitotikus katasztrófának a veszélyével jár, ami sejthalálhoz vezet (Mulay és mtsai., 2013). Állatkísérletekben a podocita hipertrófia megakadályozásával és a glomerulus megnagyobbodás kalória megszorítással való késleltetésével a glomeruloszklerózis egyaránt megszüntethetőnek bizonyult (Fukuda, Chowdhury, és mtsai., 2012).

Ugyanitt kell megemlítenünk, hogy a podociták bizonyos mértékben pótolhatók a podociták proliferációra való képtelensége ellenére is. Potenciális podocita progenitor funkcióra – humán megfigyelések alapján – a PECs (Grahammer és mtsai., 2013; Meyer-Schwesinger és mtsai., 2011) és – a renin-termelő sejtvonal kísérletes embriológiai követése alapján – egyes juxtaglomeruláris sejtek (Pippin és mtsai., 2013) alkalmasak, viszont kimutatták, hogy erre csontvelői eredetű őssejtek biztosan nem képesek (Meyer-Schwesinger és mtsai., 2011).

A *PECs* szerepének megítélése FSGS progressziójában bizonytalan. Egyfelől védő szerepet tulajdonítanak nekik, mert a glomerulus vaszkuláris pólusán található podocita és *PECs* markereket egyaránt expresszáló sejtek a hiányzó podocitákat pótolhatják, míg a tubuláris póluson található progenitor tulajdonságokkal bíró (CD24+CD133+) sejtek a sérült podocitákon túl a tubuláris epitélisejtek helyébe is léphetnek. Másfelől a Bowman-tok falát alkotó *PECs* között kialakuló réseken a periglomeruláris térbe kerülő filtrátum gyulladáskeltő lehet (LeHir & Kriz, 2007; Ohse és mtsai., 2009), valamint az „aktivált”, CD44-markert expresszáló *PECs* kötőszöveti mátrix újdonszövetképződéssel hozzájárulnak a sérült glomerulus Bowman-tokhoz való kitapadásához (Smeets és mtsai., 2011).

A *mezangiális sejtek* szerepének kutatása háttérbe szorult FSGS-ben, noha a mesangiális expanzió és a hypercellularitás az FSGS ismert elemei lehetnek, ezeket általában másodlagos jelenségeknek tartották. Ugyanakkor IgA nefropátiában megfigyelhető FSGS léziók alapján felmerül, hogy ezt társult podocitopátia okozza, vagy a mesangiális sejt sérülés önmagában képes podocita károsodást okozni, amely kérdés még megválaszolásra vár (Kriz et al., 2003). A mesangiumban felhalmozódó IgM és társult komplement elemek (C3/C1q) lerakódása komplement aktivációra utal, amely állatkísérletekben többszörösen bizonyított módon (az ECM-ban nem-specifikus elakadás feltételezését cáfolva) az FSGS progressziójához jelentős mértékben hozzájáruló mechanizmusként értékelhető (Strasheim és mtsai., 2013). Ezzel egybecsengő módon humán vizsgálatokban az IgM és C3 duplán pozitív biopsziás lelet rosszabb klinikai prognózist jelent (Fernandez-Fresnedo és mtsai., 2009; Piero Ruggenti és mtsai., 2014).

Az FSGS korai stádiumában nem tulajdonítanak jelentőséget a *glomeruláris endotél sejteknek (GEN)*. A késői stádiumban azonban a hialinózis, a habos-sejt beszűrődés és a hegesedés kapcsán egyértelművé válik az inkább másodlagos jelenségnek tartott endotél károsodás. Ismert, hogy a podociták által termelt vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) az endotél sejt felszíni receptorok stimulálásával életben maradási (prosurvival) és differenciációs jelátviteli szereppel bír (Eremina és mtsai., 2008). Ezzel szemben az endotél diszfunkció is hozzájárulhat a podocita károsodáshoz az endotél sejtekben termelt faktorok patológiás körülmények közt csökkent expressziója kapcsán. DN-ban kimutatták, hogy a hiperglikémia hatására bekövetkező endoteliális trombomodulin-függő, sejt felszíni protein C aktiváció elvesztése az oxidatív stresszre



adott podocita sejtválaszban betöltött, epigenetikai szabályozó szerepe miatt glomeruláris apoptózishoz és a DN súlyosbodásához vezet. Ugyanakkor aktivált protein C kezeléssel visszafordítható volt a redox-szabályozásban központi szerepű p66(Shc) podocita fehérje promoterén megfigyelt glükózzal indukált hipometiláció és hiperacetiláció, ami az antioxidáns válasz helyreállításával – a mitokondriális membrán potenciál és szabadgyökképződés normalizálásával – a podocitákat glükóz terheléssel szemben ellenállóbbá tette (Bock és mtsai., 2013; Isermann és mtsai., 2007).

Végül, a korábban csupán a podocita károsodás biomarkerének tartott *fehérjevizeléssel* kapcsolatban nemrégiben kimutatták, hogy kóroki tényezőként is hozzájárulhat a glomeruláris és tubuláris károsodáshoz. A vizeletterben jelenlévő albumin a podocitákat és a szomszédos parietális epitelsejteket az apoptózist felerősítő (Chang és mtsai., 2012) és retinsav felhalmozódást okozó (Chang és mtsai., 2012) hatásmechanizmussal károsítja.

Az FSGS patomechanizmusának tanulmányozására kiváló lehetőséget nyújtanak sejkultúrán és kísérletes rágcsló modellekben végzett megfigyelések, a fenti megállapítások nagy része is így született. Kísérletes megközelítésben a gyors reprodukciós ráta miatt időben viszonylag reálisan tervezhető-kivitelezhető, standardizálható, relatíve egységes, a genetikai manipuláció lehetőségének köszönhetően nagy precizitású, specifikus, valamint a humán gyakorlatban elképzelhetetlen toxikus hatások alkalmazásával számos, a kórkép fenotípusát jól leképező eszköz áll a rendelkezésünkre. Az általunk vizsgált miR-193a-indukált FSGS egérmodell, a transzgenikus megközelítést felhasználó modellek közé sorolható, amely a génszabályozásba történő művi beavatkozással hoz létre podocita vesztést sejtíváz katasztrófa által. Tanulmányunkban azonban nem a kórképet létrehozó inzultus eredetére –melyet előttünk már részletesen karakterizáltak–, hanem a progresszió lehetséges tényezőire fókuszáltunk, amikor a FSGS késői stádiumában a glomeruláris ECM összetételének feltárását tűztük ki célul.

### **1.6. Glomerulopátia rágcsló modellek**

Az irodalomban számos, kóros vizelet fehérjeürítéssel, podocita károsodással és az FSGS szövettani képével jellemezhető, széleskörűen alkalmazott rágcsló modell ismert. A glomeruláris betegség háttérben változatos kórélettani tényezők sora állhat, a különféle modellek mind-mind e tényezők egyikének szerepére fókuszálnak. A reaktív oxigén

gyökök túltermelésének kóroki szerepét mutatják a puromicin aminonukleozid- (Venkatachalam és mtsai., 1970) és az Adriamycin (doxorubicin)-indukált nefrózis (Kaplan, B.S., Renaud, L. & Drummond, 1976), valamint az Mpv17-hiányos (Binder és mtsai., 1999) modellek. Egyes podocita toxikus keringő faktorok szerepét többek között a suPAR-modell (Wei és mtsai., 2011), az immunkomplex lerakódás mechanizmusát a passzív Heymann nefritisz (Farquhar és mtsai., 1995), a GBM negatív töltésének fontosságát az ezt semlegesítő protamin szulfát perfúziós-kísérlet (Seiler és mtsai., 1975) hangsúlyozzák. Transzgenikus egér modelleken kimutatták, hogy glomerulopátiához vezet az alapmembránt érintő genetikai rendellenesség (Alport szindróma) (Kashtan és mtsai., 1986), egyes podocita specifikus gének elnyomása (Izd. miR-193a-túlexpresszióval podocita struktúrfehérjék kifejeződését irányító *Wtl* expressziójának gátlása) (Gebeshuber és mtsai., 2013), illetve a fehérjék genetikai manipulációja (Izd. *Wtl* gén kiütés nyomán csökkent nefrin termelés), a HIV-okozta vesekárosodás (Barisoni és mtsai., 2000), és több genetikailag meghatározott DN modell (pl. *ob/ob*, *eNOS-deficient*) (Alpers & Hudkins, 2011), valamint a zsírdiétával létrehozott elhízás modell (Szeto és mtsai., 2016b) is.

### **1.7. Az extracelluláris mátrix összetétele egészségben és betegségben**

Az ECM fő alkotói a kollagének és a lamininek, amelyek szorosan szabályozott termelési és lebomlási egyensúlya biztosítja a kötőszövet egészséges homeosztázisát. Az ECM átépülésével kapcsolatos kórképek, mint a vesefibrózis és a vese malignus folyamatai az utóbbi években szükségszerűen ráirányították a figyelmet az ECM fehérjék ciklikus degradációs-megújulási (angolul turnover) dinamikus jelenségének a fontosságára (Karsdal és mtsai., 2013, 2016; S. N. Kehlet és mtsai., 2016; Stephanie N. Kehlet és mtsai., 2018; Nielsen és mtsai., 2015; Sand és mtsai., 2013; Willumsen és mtsai., 2013, 2014). Régóta ismert, hogy különféle kórállapotokban a GBM-ban megfigyelhető egyes kollagének felhalmozódása. Mechanisztikusan értelmezve az ECM fehérjék felhalmozódása vagy fokozott termelődése, vagy a természetes lebomlás csökkent üteme kapcsán jöhet létre. A mezangiális tér főként I-es és IV-es  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  típusú kollagén lerakódás miatti kiszélesedése típusos jelenség mind a nem diabéteszes, zsírdiéta által okozott elhízással kapcsolatos glomerulopátiában (Declèves és mtsai., 2014; Szeto és mtsai., 2016b), mind a DN-ban (Tang és mtsai., 2017; Yagame és mtsai., 1995; Zeisberg és mtsai., 2002). A diabéteszes vesebetegségben fokozott kollagén termelődést

más patológiás jelek (mezangiális sejt és mátrix hiperplázia, szklerózis) alapján (ú.n. mezangiális sejt aktivációnak) a mezangiális sejtek megnövekedett I-es és IV-es típusú kollagén szintézisének tulajdonítják (Lv és mtsai., 2014). Ezen túl *in vitro* sejt kultúrán nyert és egér nefrotoxikus nefritisz vizsgálatok eredményei támasztják alá, hogy a gyulladáskeltő TGF- $\beta$  citokin kezelés fokozott kollagén termeléshez vezet (Sumi és mtsai., 2007).

Ugyanakkor főleg az emelkedett vércukorszint szerepére utalva több tanulmányban (diabéteszesek humán mintáin, sejt kultúrán és patkány kísérletben) leírták a mátrix metalloproteázok (MMP-k, főként: MMP-2, MMP-9 és MT1-MMP) és gátló fehérjék a TIMP-ek (TIMP-1, -2) megváltozott egyensúlyát, amely az ECM fehérjék csökkent degradációjához vezethet (Ohtomo és mtsai., 2008; Seung és mtsai., 2005; Wong és mtsai., 2011; J. Yang és mtsai., 2009).

Egy Sprague-Dawley patkány modellen pedig a hiperinzulinémia és a szabad zsírsavak (free fatty acids, FFAs) kóros szerepét igazolták a MMP/TIMP egyensúly befolyásolásában, amely a célszervre jellemző, egymástól eltérőtől, látszólag ellentmondó módokon – a mátrix fehérjék fokozott lerakódása vagy lebontása útján – járult hozzá aorta atherogenezishez vagy máj fibrózishoz (Boden és mtsai., 2008; Boden & Song, 2008).

A közelmúltban meghatározták az egészséges ember és a vad-típusú egér glomeruláris ECM-összetételét (Byron és mtsai., 2014; Hobeika és mtsai., 2017; Lennon és mtsai., 2014). Sőt, az eltérő genetikai háttérrel rendelkező egerek glomeruláris ECM-jének és normál (egészséges) fehérjeürítésének összehasonlítása olyan fehérjék szintézisének megváltozását tárta fel, amelyek fokozhatják a betegségekre való hajlomot (Randles és mtsai., 2015). Azonban vizsgálatainkat megelőzően FSGS-ben a glomeruláris ECM kóros összetételének fehérje szintű leírására még nem került sor. A glomeruláris ECM összetételében bekövetkező változások feltárása az FSGS progressziója során hasznos lehet e kóros folyamatok alaposabb megértése és az új terápiás lehetőségek fejlesztésének elősegítése érdekében. E nemes cél eléréséhez igyekeztünk vizsgálatainkkal hozzájárulni.

### **1.8. Komplement rendszer CKD-ben**

A vese a kóros komplement aktivációra nézve a legérzékenyebb parenchymás szervünk. A komplement rendszer elsődleges – veleszületett vagy szerzett – zavarainak lehet vese

manifesztációja (hemolítikus urémiás szindróma (HUS)), illetve egyes vesebetegségek patomechanisztikus eredetét maga a komplement aktiváció (trombotikus mikroangiopátia (TMA), C3GN, dense deposit disease) képezi, de ettől függetlenül a komplement aktivációt járulékos tényezőként azonosították a közvetítő útvonalak egyikeként, már több, különböző eredetű glomerulopátia illetve CKD patomechanizmusában.

A komplement rendszer a veleszületett immunitás egyik alappillére, amely fontos szerepet játszik a kórokozókkal szembeni védelemben, az angiogenezis és a véralvadási rendszer fiziológias működésének fenntartásában. Eszköztárában szerepelnek az opszonizáció, az immun komplexek és az apoptotikus sejttermelék eltávolítása, a kemoattraktánsok termelése és gyulladásosejtek kemotaxisának elősegítése vazodilatáció útján, valamint adaptív T- és B-sejt válasz felé közvetítő funkciója (Tan & Zhao, 2018). Mai tudásunk szerint a komplement kaszkádot több, mint 40 fehérje alkotja és aktivációjára a klasszikus, a mannóz-kötő lektin és az alternatív útvonalon keresztül kerülhet sor (Walport, 2001). Az aktiváció mindhárom formája a C3 által meghatározott közös útban fut össze, a C3 és C5 konvertáz enzimek a C3 és C5 komplement komponenseket hasítva aktiválják azok működését, ami hasonló módon további komplement elemek kaszkád-szerű aktivációjához vezet. A komplement aktiváció egyik végrehajtó funkcióját a C5b-9 fehérjékből összeálló membrán károsító komplex (MAC) tölti be, amely a sejtmag nélküli struktúrák pl. vörösvértestek vagy tokos baktériumok membránfelszínéhez kapcsolódva sejt lízist okoz (Andrighetto és mtsai., 2019). Ezzel szemben az eukarióta, maggal rendelkező sejtekhez kötődés lízis helyett általában immun aktivációt eredményez (Jane-wit és mtsai., 2013), ami szövetsérülést hoz létre (Adler és mtsai., 1986). A komplement rendszer működésének szabályozását plazma fehérjék (pl. a komplement faktor H (CFH)) és sejtmembránhoz kötött fehérjék (pl. decay-accelerating factor (DAF); membrane cofactor protein (MCP; CD46) látják el.

A komplement rendszer **primer, kóros aktivációja** a humán klinikumban TMA képében nyilvánul meg, amely lokálisan elsődlegesen a vesét (HUS) vagy a központi idegrendszert (trombotikus trombocitopéniás purpura, TTP) érintő fokozott véralvadással és egyidejűleg a véralvadási kaszkád elemeinek a felhasználódása miatt, az ún. konzumpciós koagulopátia részeként következményes, nem-immun trombocitopéniával és más szisztémás jelenségekkel jár. A HUS hátterében az esetek 90%-ában Shiga-toxinnal bíró *Shigella* vagy *E. coli* fertőzés áll, az esetek fennmaradó 10%-ban azonban a

tünetekért a komplement rendszer más ok miatti kóros aktivációja felelős (atípusos HUS). Az atípusos HUS esetek 40% szekunder eredetű, malignus hipertenzióval, gyógyszerhatással, fertőzéssel, daganatos vagy autoimmun betegséggel magyarázható, azonban 60%-ban primer komplement rendszer betegség, öröklött vagy szerzett elváltozás folytán túlzott aktivációval járó állapot áll fenn. Ilyen lehet többek között a gátló fehérjék a H- és I-faktor és a membrán kofaktor fehérje (MCP, CD46) funkcióvesztéses mutációja; az aktivátor fehérjék (C3, B-faktor) funkció nyeréses mutációi, vagy olyan szerzett antitestek, amelyek például a H-faktor működését befolyásolják. Mindezek megnyilvánulásához gyakran egy aktuális infekció vagy terhesség a kiváltó tényező (Goodship és mtsai., 2017).

A komplement rendszer kóros működése a fentiekén túl, krónikus vesebetegségek patomechanizmusában *járolékos tényezőként* is szerepelhet. *Lupusz nefritiszben* a komplement rendszer szinte minden ágát érintő eltéréseket leírtak. A patomechanizmus fókuszában a komplement H-faktor funkciózavara áll, amelynek a háttérében genetikai eltérések (pontmutációk, SNP-k) (F. Wang és mtsai., 2012) és autoantitestek szerepét is kimutatták (pl. monomer vagy módosult CRP-ellenes) (Li és mtsai., 2017). Az anti-C1q-antitestek a korai apoptotikus sejteken megakadályozzák a makrofágok és az immunkomplexek vörösvértestek általi eltávolítását (Pang és mtsai., 2016; X. Yang és mtsai., 2012). A komplement H-faktor funkciózavara fentiekén túl az alternatív útvonal szabályozási zavarához is hozzájárul (X. Yang és mtsai., 2012).

Az *anti-neutrofil citoplazmatikus antigén (ANCA) asszociált-vaszkulitisz (AAV)* egy súlyos, életet veszélyeztető autoimmun betegség, amelynek háttérében egyre több állatkísérletes és klinikai eredmény alapján a komplement útvonal aktivációja feltételezhető (Xing és mtsai., 2009). A vérplazmában, a vese szövetben és a vizeletben egyaránt megjelenő, és a betegség aktivitásával változó mennyiségű aktivált Bb faktor az alternatív útvonal szerepére utal (S.-J. Gou és mtsai., 2013; S. Gou és mtsai., 2012), illetve a komplement rendszer aktivációjában a C5a központi szerepe körvonalazódik (S. Gou és mtsai., 2012; Huang és mtsai., 2015). A neutrofil granulociták stimulációja C5a és ANCA antitestekkel neutrofil légzési robbanást (respiratory burst) és degranulációt, valamint a szöveti faktort kifejező micropartikulumok (TF-MPs) és a neutrofil extracelluláris csapdának nevezett (NETs) fehérjék expresszióját indukálja, valamint aktiválja a koagulációs kaszkádot, és thrombin termeléséhez vezet (Huang és mtsai.,

2015). Így, a feltételezés szerint, a neutrofilek, az ANCA, a komplement és vérárvadási rendszer egy pozitív visszacsatolási folyamatot alkotva vezetnek az AAV kialakulásához (Chen és mtsai., 2017).

*IgA nefropátiában* a betegek 20-25%-ában súlyosabb klinikai képpel társuló mannóz-kötő lektin, komplement H-faktor és C3b lerakódás nyomán a mannóz-kötő lektin komplement útvonal szerepét feltételezik, ugyanakkor az MBL túltermelését, illetve hiányát egyaránt leírták a betegséggel összefüggésben (Guo és mtsai., 2017; Roos és mtsai., 2006). Genom-szintű analízissel (GWAS) a komplement H-faktor egyik receptora, a CFHR5 genetikai variációinak az IgA nefropátiára hajlamosító szerepét írták le (Gharavi és mtsai., 2011; Kiryluk, 2016; Zhai és mtsai., 2016).

*Monoklonális gammopátiákban* a nem-malignus vagy premalignus plazmasejt klónok által termelt antitestekkel okozott vese elváltozásokat (C3 glomerulopátia (C3GN), TMA) észleltek (Leung et al., 2012), és kimutatták az alternatív komplement rendszer szabályozási zavarát, amelyet a komplement H-faktort inaktiváló specifikus IgG $\lambda$  monoklonális könnyű lánc okozott (Jokiranta és mtsai., 1999; Schurder és mtsai., 2017). Bár a komplement-mediált glomerulonefritisz mechanizmusnak még nem minden részlete ismert, glomerulonefritiszben való tesztelés során már több komplement-gátló kezelést találtak kielégítő hatékonyságúnak és kellően biztonságosnak (Tan & Zhao, 2018).

***FSGS-ben*** mind állatkísérletekben, mind humán klinikai gyakorlatban ismert egyes immunglobulinok és komplement elemek lerakódása a glomeruláris mátrixban. A podocitákat érő sértést követően felszínre kerülő glomeruláris neoepitópokhoz IgM antitestek kötődnek, amelyek aktiválhatják a komplement rendszert a klasszikus útvonalon keresztül, illetve az alternatív komplement út csökkent szabályozása szintén hozzájárulhat a folyamathoz (Strassheim és mtsai., 2013). Két független, humán primer FSGS vese biopsziás anyagon végzett vizsgálat (Mirioglu és mtsai., 2019; Y. M. Zhang és mtsai., 2016) bizonyította, hogy az észlelt glomeruláris IgM és C3 lerakódás rosszabb terápiás válasszal és csökkent életkilátásokkal jár. A vese szövettani vizsgálatokban észlelt IgM és C3 lerakódás független rizikó tényezőnek bizonyult a terápia refrakter tulajdonságra nézve. A páciensek mintegy felében észlelték IgM és kizárólag ezen esetek felében C1q és C3 elemek jelenlétét (Y. M. Zhang és mtsai., 2016), ami az IgM<sup>+</sup> C3/C1q<sup>+</sup> státusszal járó legrosszabb kimenetel, a betegség progressziójában a komplement

aktiváció szerepére utalt. Noha több, B sejt kimerülést célzó állatkísérletes megközelítés sikeresen csökkentette a glomeruláris IgM lerakódást és ezáltal az albuminuria mértékét (Strassheim és mtsai., 2013), ugyanakkor több primer, humán FSGS-ben végzett B-sejt elleni antitest terápia próbálkozás (rituximab) ellentmondásos eredményekre vezetett (Fernandez-Fresnedo és mtsai., 2009; Piero Ruggenenti és mtsai., 2014). Az FSGS gyorsabb progressziójával járt az alternatív komplement útvonal fokozott aktivációjának tulajdonítható alacsony szérum C3 szint is (J. Liu és mtsai., 2017). Humán FSGS biopsziás anyagban H faktor és C3 génben keletkezett SNP mutációkat dokumentáltak (Sethi és mtsai., 2012), illetve más vesebetegségekkel összehasonlítva az FSGS-es páciensek plazma és vizelet mintájában C3a, C3b, Ba, Bb, C4a, sC5b-9 komplement elemek dúsulását írták le (Thurman és mtsai., 2015). Mindezek alapján egyre nagyobb biztonsággal feltételezhető a komplement aktiváció szerepe az FSGS progressziójában, amelynek tanulmányozhatóságát miR-193a-indukált egérmodellünkben joggal feltételeztük.

### **1.9. Obezitás és zsíretetéssel indukált rágcsló modellek: zsírszöveti átépülés szerepe a szisztémás gyulladásban és a vesében**

Az elmúlt két évtizedben részletesen tanulmányozták az elhízás és a metabolikus szindróma következményeit magas zsírtartalmú diétával indukált rágcsló modelleken (Buettner et al., 2007; Brown & Panchal, 2011). Napjainkban már széleskörűen elfogadott, hogy az elhízásban kialakuló zsigeri zsírszöveti (visceral adipose tissue, VAT) gyulladás a teljes szervezetre nézve meghatározó patomechanizmus. Az elhízásban a VAT lokális gyulladással (Nishimura és mtsai., 2008) és átépüléssel (Sun és mtsai., 2011) jellemezhető változáson megy keresztül. Az irodalom erre a jelenségre endokrin szervvé válásként utal, mivel a VAT a vérplazmába kiválasztott gyulladáscsökkentő citokinek és zsírszöveti hormonokkal krónikus, alacsony szintű, szisztémás gyulladást tart fenn, amely olyan távoli szervek működését is befolyásolja, mint a szív- és érrendszer, a máj és a vese (Hotamisligil, 2006).

A zsírszöveti gyulladás jellegzetes mutatója a monocita eredetű makrofágok (adipose tissue macrophages; ATMs) (Weisberg és mtsai., 2003) felszaporodása és aktivációja a zsírszövetben. A folyamat során az alternatív-módon aktivált, a zsírszövetben normál állapotban jelenlévő gyulladás-ellenes, M2-expressziós markerekkel (arginase-1, IL-10 szekrécióval) jellemzett, inzulin rezisztenciától védő hatású makrofágok hatását elfedi a

nagyszámú gyulladáskeltő M1-típusú (tumor nekrozis faktor-alfát (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-6-ot és indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) kifejező makrofágok túlsúlya, ami gyulladáshoz vezet, inzulin rezisztenciát és kóros zsírsajt működést okoz (Lumeng és mtsai., 2007; Osborn & Olefsky, 2012; Winer & Winer, 2012). A folyamatban kemotaktikus jelző molekulák (pl. az adipociták és makrofágok által termelt kemokin, a monocita kemoattraktáns fehérje (monocyte chemoattractant protein (MCP)-1)) (Kanda és mtsai., 2006) és leukocita integrinek szerepét írták le (Flick és mtsai., 2004).

Egy obezitással összefüggő vesebetegséget vizsgáló patkány kísérletben nemrégiben kimutatták, hogy a zsíretetés az anyagcsere rendellenességek és a szérumban megfigyelhető szignifikáns TNF- $\alpha$  és IL-6 citokin koncentráció emelkedés mellett a vese glomerulusban is gyulladáshoz vezet, amit az MCP-1 megnövekedett expressziója és a vélhetően ezáltal létrejött makrofág beáramlás igazolt (Zhao és mtsai., 2018). Számos klinikai megfigyelés is rámutat (D'Agati és mtsai., 2016; Kambham és mtsai., 2001; Y. Wu és mtsai., 2006), hogy a zsírszöveti gyulladás által vezérelt elhízás-betegség részjelenségeként glomerulopátiával (ORG) is számolnunk kell. Azonban az obezitással okozott vesebetegségben egyelőre nem kellő mértékben tisztázottak a kóreltani összefüggések részletei, a gyulladás szerepe mellett például a passzív intracelluláris lipid lerakódás elméletével szemben a megváltozott lipid anyagcsere, mint aktív kóros tényező szerepe is felmerült (Bobulescu, 2010; De Vries és mtsai., 2014; Mount és mtsai., 2015). Ugyanakkor a betegség epidemiológiai súlya ellenére relatíve kevés állatkísérletes modell áll rendelkezésünkre. E szempontok indították az eddigiekben obezitás és prediabetes témakörében nem tanulmányozott Long Evans patkány modell vizsgálatára.

### **1.10. Ismereteink a Long Evans patkány nefropátiáról más modellekben**

A klasszikus Long Evans patkány törzsön végzett tanulmányok már vizsgálták a veseműködést alakulását különböző betegség modellekben.

A klasszikus Long Evans patkányból kitenyésztett törzs az *Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)*, és kontrollja, a *Long Evans Tokushima Otsuka (LETO)* patkány szolgál 2-es típusú diabetes és elhízásos modellként. Az OLETF patkányokban a kolecisztolektin gén veleszületett mutációja miatt nincs működő CCK-A receptor, ami főleg magas lipid tartalmú táplálék esetén kóros CCK szekrécióhoz, a jóllakottság hiányához vezet. Az OLETF patkányok fenotípusát ezért – az emberi inzulinfüggő



cukorbetegséghez hasonló – enyhe túlsúly, hiperinzulinémia, hipertrigliceridémia, hiperkoleszterinémia, késői kialakulású, krónikus hiperglikémia, glükóz intolerancia és inzulin rezisztencia, valamint vese szövődmények jellemzik (Kawano és mtsai., 1992). Normális táplálás mellett az OLETF patkányokban spontán 2-es típusú diabéteszt, magas zsírtartalmú diétán súlyos elhízást észleltek (Schwartz és mtsai., 1999). Az OLETF patkányokon diabéteszes és prediabéteszes állapotban végzett kimerítő vese kórélettani vizsgálatok az angiotensin II és a lipotoxicitás kóroki szerepét tárták fel (Nagai és mtsai., 2005; Tohma és mtsai., 2004; W. Wang és mtsai., 2006). Ugyanakkor a normális öregedési folyamat részeként a diabéteszes OLETF patkányok spontán vese érintettsége viszonylag későn, csak 40 hetes korban alakult ki mezangiális mátrix proliferációval és GBM megvastagodással jellemezhető diffúz glomeruloszklerózis formájában (Kawano és mtsai., 1994). Ez arra utalhat, hogy a Long Evans törzs a rágesálók között a normális veseműködés megőrzése szempontjából relatív erőteljes genetikai ellenálló-képességgel rendelkezik.

Egy másik törzs, a hasnyálmirigy szigetek életkorfüggő, progresszív fibrózisa folytán  $\beta$ -sejt vesztő, inzulin szekréciózavarban szenvedő, hiperglikémiás, spontán diabéteszes, de nem túlsúlyos *Long-Evans Agouti (LEA)* patkányok ugyanakkor krónikus vizelet glükóz ürítés következtében progresszív tubuláris károsodást mutatnak. A vesekárosodás a sejtplazmában hialin cseppek megjelenésével, a proximális tubuláris epitelsejt réteg eltűnésével, a helyi alapmembrán megvastagodással és glomeruláris betegség jelei nélkül fehérjevizeléssel jár (Okamura és mtsai., 2013). A Wilson-kórnak megfelelő beltenyészett *Long-Evans Cinnamon (LEC)* patkányokban szintén dokumentáltak krónikus vesekárosodást, amely inkább az *Atp7b* génmutáció okozta kóros réz anyagcsere zavar és májon kívüli rézlerakódás talaján kialakuló réz toxicitással, és következményes oxidatív stresszel, mintsem a törzs vesebetegségre való genetikai fogékonyságával magyarázható (HAYASHI és mtsai., 2005; Kitamura és mtsai., 2005; Nomiya és mtsai., 1999)

### **1.11. A megváltozott lipid anyagcsere szerepe CKD-ben**

A normális zsír anyagcsere a veseműködés szempontjából alapvető, mivel a vesesejteknek, különösen a nagy energia igényű és viszonylag kis glikolítikus kapacitású proximális tubulus sejteknek egyik fő ATP-forrása a szabad zsírsavak (free fatty acids (FFAs)) mitokondriális béta-oxidációja (Balaban & Mandel, 1988). Az aktuális

energetikai követelményen felüli, felesleges FFAs azonban lipid cseppekként a sejten belül tárolódnak glicerollal észterifikált triglicerid formájában. Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap a vese zsír- és energia-metabolizmus szabályozás zavara a vesebetegségek kialakulásában (Mount és mtsai., 2015). A sejten a lipidek túlzott mennyiségű jelenléte fokozott oxidatív stresszhez, endoplazmatikus retikulum (ER) stresszhez, sejtvezérlési rendszeri változásokhoz és a gyulladáskeltő folyamatok aktivációjához vezet (Herman-Edelstein és mtsai., 2014; Martínez-García és mtsai., 2015; Van Der Heijden és mtsai., 2015). A lipid felhalmozódás a krónikus fibrotikus vesebetegség közös útjának tűnik, mivel megfigyelhető számos különféle vesekárosodás modellben (remnant vese, akut vesekárosodás és diabetetikus nefropátia) (Bobulescu, 2010). Azonban a lipid felhalmozódás kialakulásával és a lipidek vesefunkcióra gyakorolt káros hatásának pontos mechanizmusával kapcsolatban nincs egyetértés a szakirodalomban. A közvetlen lipotoxicitással (Bobulescu, 2010; Savary és mtsai., 2012) szemben áll az elsődlegesen sérült lipid anyagcsere és következményes lipid lerakódást feltételező másik elmélet (Deji és mtsai., 2009; Jiang és mtsai., 2005; Kang és mtsai., 2015; Kume és mtsai., 2007). Az intracelluláris lipid zárványok jelenléte elhízásban kifejezetten jellemző patológiai elváltozás mind a diétával indukált rágszáló modellekben, mind a humán klinikai autopsziás szövettani anyagban a különböző parenchymás szervekben, többek között a vesében is. A lipid zárványok fokozottan érintik a podocitákat, a mezangiális sejteket és a proximális tubuláris epitelsejteket, ami arra utal, hogy az elhízás-okozta veseelégtelenség kialakulásában központi jelentőséggel bírhat a normálistól eltérő lipid anyagcsere és esetleg a lipotoxicitás (De Vries & Rabelink, 2013; Herman-Edelstein és mtsai., 2014; Martínez-García és mtsai., 2015). A podociták különösen érzékenyek a telített szabad zsírsav palmitinsavra, amely ER stressz révén sejthalálhoz vezet (Sieber és mtsai., 2010). Ez azonban megelőzhető a stearyl-CoA deszaturáz I enzim működésének serkentésével és egyszeresen telítetlen szabadzsírsavakká alakításával (Sieber és mtsai., 2010) (Sieber 2013), illetve a zsírsav oxidáció stimulációjával (Kampe és mtsai., 2014). Több, a zsírdiétával indukált elhízás egér modellen végzett vizsgálat is utalt az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) csökkent működésének központi szerepére a csökkent zsírsav oxidáció, az energetikai egyensúlyvesztés és a lipid felhalmozódás hátterében (Cammisotto & Bendayan, 2008; Declèves és mtsai., 2011; Hallows és mtsai., 2010; Kume és mtsai., 2007; Sharma és

mtsai., 2008). Az AMPK farmakológiai aktivációját előnyösnek találták az elhízás okozta krónikus vesebetegséggel szembeni védelemben (Declèves és mtsai., 2011, 2014; D. Kim és mtsai., 2013). A CD36 transzgenikus egérben a szabad zsírsav transzlokáz enzim fokozott szintézise miatt csökkent zsírsav oxidáció elsődleges tényező a fibrózis kialakulásában, és a lipid felhalmozódás csak következménynek tekinthető (Kang és mtsai., 2015). Egy humán elhízásos glomerulopátiában végzett gén-expressziós mikroarray vizsgálat a hat leginkább megváltozott szabályozású gén között három lipid anyagcserében résztvevő gént azonosított: a LDL-receptort, a zsírsavkötő fehérje 3-t (fatty acid binding protein 3; FABP-3) és a szterol szabályozó elemkötő fehérje 1-t (sterol regulatory element binding protein 1; SREBP-1) (Y. Wu és mtsai., 2006). DN-s betegek vesebiopsziás anyagában is a lipid felvételben szereplő fehérjék fokozott, míg a zsírsavak béta-oxidációját végző enzimek csökkent működését észlelték (Herman-Edelstein és mtsai., 2014)

Kísérletes és humán vizsgálatok tehát egybehangzóan mutatják, hogy lipid anyagcserében észlelhető egyensúlyvesztés mind mikromorfológiai, mind molekuláris biológiai szinten tetten érhető. Az általunk vizsgált patkány modellben a lipid felhalmozódás megfigyelését a vesében, illetve a más szervekben tapasztalható hasonló folyamattal való összehasonlítást terveztünk.

### **1.12. Az elhízás paradoxon**

A túlsúly és az elhízás közismert módon a lipid anyagcsere, magas vérnyomás, 2-es típusú cukorbetegség (Lavie és mtsai., 2009), valamint a szív és érrendszeri megbetegedések független rizikó faktorát jelentik. Ugyanakkor számos populációs megfigyelésen alapuló tanulmány rámutatott arra, hogy bizonyos betegségek szempontjából a túlsúlyos és a kisebb mértékben elhízott betegcsoport hosszú távú túlélése meglepő módon jobb volt, mint a normális testsúlyú személyeké. Ezt a jelenséget „elhízás paradoxon”-nak, illetve „fordított epidemiológiá”-nak nevezzük (Flegal és mtsai., 2013). Az elhízás paradoxont az obezitással közvetlenül összefüggő krónikus endokrin betegségek, mint a csontritkulás és a 2-es típusú diabétesz, illetve az utóbbi szövődményének tekinthető krónikus szívelégtelenség, koszorúér- és krónikus vesebetegséggel kapcsolatban egyaránt megfigyelték. E kórképek és az elhízás kapcsolata alapvetően egy J- vagy U-alakúnak mondható túlélési görbével írható le, ahol a kórosan soványak és extrém mértékben

elhízottak túlélése a legrosszabb, azonban nem világos, hogy a normális vagy túlsúlyos állapot az előnyösebb-e (Cheung és mtsai., 2017).

Kifejezetten a vesebetegségek vonatkozásában ismert, hogy az elhízás egyaránt krónikus vesebetegséghez vezet indirekt (2-es típusú diabétesz, magas vérnyomás és érlemeszesedés közvetítésével) és direkt patofiziológiai tényezők révén (vese hemodinamikai változások, gyulladással, adipokinek, növekedési faktorok termelése). Ugyanakkor a már kialakult vesebetegségben a testsúlyfelesleg védő faktornak tűnik. Az utóbbi évek vizsgálatai e látszólag ellentmondásos jelenség hátterében részben azonosítani tudtak olyan, a vizsgálati módszerekben rejlő anomáliákat, amelyek félrevezető megállapításokhoz vezettek. Például dializált vesebetegek esetében a BMI nem tükrözi az izmos/zsíros testtömeg arányt, ami inkább meghatározója a túlélésnek. Az izomtömegre korrigált BMI-vel számolva a zsírfelülleg az átlag populációhoz hasonlóan rizikótényezőnek bizonyult a gyulladás, oxidatív stressz és érlemeszesedés fokozott progressziója miatt (Beddhu és mtsai., 2003). A kritikus állapotú betegek esetében a rövid túlélés miatt a rizikófaktorok különböző súllyal érvényesülhetnek (az alultápláltság rövidebb vs. az érlemeszesedés időben hosszabb kifizetésű előnytelen hatása) (Kalantar-Zadeh és mtsai., 2005; Park és mtsai., 2017), valamint felvetették az elhízás és CKD közötti fordított ok-okozati kapcsolat és a túlélési szelektációs előny (survival bias) szerepét is (Kalantar-Zadeh és mtsai., 2005; Park és mtsai., 2017). Ugyanakkor más vizsgálatok az elhízásban ténylegesen jelenlévő, bizonyos állapotokban potenciálisan előnyös tényezőkre hívták fel a figyelmet. Például a fehérje és energia éhezés veszélyére nézve a metabolikus tartalékok előnyt jelentenek a gyulladással, infekciókkal szembeni fogékonyság szempontjából. Ennek magyarázata az, hogy a nagyobb koncentrációban jelenlévő plazma lipidek és lipoproteinek káros endotoxinokat képesek lekötni, a zsírszövet pedig alkalmas lehet az urémiás toxinok kivonására és a fokozott TNF-alfa receptor termelés miatt képes lehet megkötni, neutralizálni a keringő TNF-alfát (Feldman és mtsai., 2000; Mohamed-Ali és mtsai., 1999). A neurohormonális aktivitás (szimpatikus tónus, renin-angiotenzin aktivitás) csökkenése és az emelkedett vérnyomás miatt stabilabb hemodinamika előnyös lehet a hemodialízis során az ultrafiltrációs térfogattal szemben megnövekedett toleranciában, és a dialízis utáni hipotónia elkerülésében (összefoglaló közlemény lsd. (Rhee és mtsai., 2016)).

## 2. Célkitűzések

A disszertáció célja a glomerulopátiák patomechanizmusának tanulmányozása volt két különböző etiológiájú, egy kezdeti és egy előrehaladott stádiumú állatkísérletes megközelítésben. Ehhez a következő részcélokat tűztük ki:

A zsíretetéssel létrehozott elhízással és kezdődő szénhidrát anyagcserezavarral jellemezhető Long-Evans patkányban:

1. jellemezni az elhízás és prediabétesz okozta vesekárosodást, illetve megfigyeléseink alapján következtetni kialakulásának legkorábbi eseményeire;
2. feltárni a vese érintettség és más szervi elváltozások közti feltételezett összefüggéseket.

A miR-193a túlexpresszióval indukált FSGS modell egéren:

3. Előrehaladott FSGS-ben potenciálisan fontos extracelluláris mátrix (ECM) géneket azonosítani a glomeruláris fehérje tartalom minőségi és mennyiségi elemzésével;
4. Eredményeinket megerősíteni és kiegészíteni egér-ember glomeruláris génexpresszió mintázatok összehasonlításával, valamint a génexpresszió és a fehérje előfordulási adatok összevetésével.
5. Rámutatni olyan kulcs génekre és kórélettani folyamatokra, amelyek terápiás megközelítésétől a jövőben az FSGS hatékonyabb kezelése remélhető.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Obezitás és prediabéteszes korai vesehatásainak vizsgálata patkányban

##### 3.1.1. Obez, prediabéteszes Long Evans patkány modell

Az elhízás és prediabéteszes okozta vesekárosodás vizsgálatát a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetnek, Kardiovaszkuláris és Metabolikus Kutatócsoportjával kollaborációban, zsíros diétán tartott, pankreász  $\beta$ -sejt toxikus anyag (streptozotocin; STZ) egyszeri injekciójával indukált Long Evans fajtájú patkányokon végeztük. A kísérletben felhasznált hím, 5–7 hetes korú, Long-Evans patkányokat a Charles River cégtől (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, Amerikai Egyesült Államok) szereztük be. A szállítás után 1 hetes akklimatizációt követően az állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk: kontroll (KON;  $n = 20$ ) és prediabéteszes (PRED,  $n = 20$ ). A KON csoportot normál, a PRED-t 40% sertészsírral kiegészített (high-fat diet, HFD) tápon tartottuk (Koncsos és mtsai., 2016). Az etetési szakaszban az állatok táplálék és folyadékbevitel igény szerint szabadon történt (*ad libitum*), 12 h–12 h nappali fény/éjszakai sötét ciklusok és 21 °C körüli szobahőmérséklet fenntartása mellett. A prediabéteszes kialakulásának elősegítése céljából, a szakirodalomból vett módon (Mansor), a HFD csoport tagjait a 4. etetési héten, egyszeri, alacsony dózisú 20 mg/kg testsúly (ttkg) STZ (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerikai Egyesült Államok) intraperitoneális (i.p.) injekcióval, a kontroll csoportot hasonlóképpen, azonos térfogatú (STZ-nélküli) citrát puffer oldószerrel kezeltük. A kísérleti és állatetikai engedély az Amerikai Egyesült Államok (US National Institute of Health, 8. kiadás, 2011; jóváhagyva 2012. december 27-én) és a Semmelweis Egyetem Állatetikai bizottságának rendelkezéseivel összhangban állt (engedélyszám: XIV-I-001/2103-4/2012).

##### 3.1.2. Vese és más szöveti minta gyűjtés

Húsz hetes etetést követően a 21. héten pentobarbitál (60 mg/kg, i.p.; Euthasol; Produlab Pharma, Raamsdonksveer, Hollandia) altatásban az egyik alcsoporton részletes szív funkcionális vizsgálatokat végeztünk (echocardiographia, hemodinamikai analízis; részletekkel kapcsolatban utalok a megjelent publikációra (Koncsos és mtsai., 2016)). A másik alcsoportban az állatokat a hasi aortán keresztül elvéreztettük, és a vért EDTA-előtöltött csövekbe gyűjtöttük, majd a szív eltávolítása *in toto* történt. A zsírdiéta és prediabéteszes állapot renális hatásainak vizsgálatára, elsősorban ez utóbbi alcsoportból

9 KON és PRED állatból vese mintát vettünk. A mellkasi aorta szakasz lekötése után az abdominális aortát a veseartériák eredésétől disztálisan kanüláltuk és 50–80 mL jéghideg fiziológiás só oldattal perfundáltuk a vér teljes kimosódásáig a hasi szervekből (máj, vesék). A vizsgálat szívvvel kapcsolatos végpontjainak mérése érdekében heparin vagy más szisztémás véralvadásgátló szert nem használtunk. A vesék, a máj, az epididimális és a szubkután lágyéki fehér zsírszöveteket eltávolítottuk, súlyát analitikai mérlegen mértük. Máj és vese mintákat 24 órán át 4% pufferelt formalinban fixáltuk, majd vízelvonást követően paraffinba ágyazva szövettan és immunhisztokémia céljából tároltunk. Szárzójégen lassan fagyasztva máj és zsírszöveti mintákat is vettünk Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetech, Európa)-ba ágyazva. A jobb vesékből makroszkópos kontroll mellett steril sebészi szikével a vesekérget és vesevelőt szétválasztva, illetve máj és zsírszövet darabokat folyékony nitrogénben gyors fagyasztva, fagyasztócsövekben  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltunk további molekuláris feldolgozásig.

### **3.1.3. Funkcionális vese paraméterek**

A EDTA-s teljes vérmintát  $1500\times g$ , 10 perc,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n centrifugálva elválasztottunk a vérplazmát, a vizeletet az üledék eltávolítására  $3000\times g$ , 10 perc,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n centrifugáltuk, majd a felülúszókból vett mintákat további analízisig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltunk.

A plazma karbamid-urea, plazma és vizelet kreatinin meghatározás 96-lyukú lemezen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Németország), kolorimetriás, enzimatikus esszével történt (#9581C és #9571C; Diagnosztikum Kft. Budapest), a vizelet fehérje meghatározást pirogallol vörös kolorimetriás, enzimatikus esszével (#42051/DC, Diagnosztikum Kft. Budapest) végeztük és az eredményt vizelet kreatininre normalizáltuk. Az optikai denzitás mérése  $598\text{ nm}$ -n (fehérje) illetve  $555\text{ nm}$ -n (kreatinin) a SpectraMax 340 Microplate Readerrel (MolecularDevices, Sunnyvale, CA, Amerikai Egyesült Államok) történt. A koncentráció számításához SoftMax® Pro szoftvert (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. A plazma és vizelet lipocalin-2 (Lcn2) koncentrációkat patkány neutrofil-zselatináz asszociált lipokalin (Lcn2/NGAL) ELISA-val (DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, Amerikai Egyesült Államok) mértük. Az optikai denzitást  $450\text{ nm}$ -n,  $544\text{ nm}$  hullámhossz korrekciós beállítás mellett Victor3 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, WALLAC Oy, Turku, Finnország) mértük, a koncentráció

kiszámításához 4 paraméteres logisztikus görbe-illesztést használtunk (four-parameter logistic curve-fit; Work Out; Dazdaq Ltd., Brighton, Nagy Britannia).

### **3.1.4. Génexpressziós vizsgálatok vese és zsírszöveti mintákon**

#### **3.1.4.1. RNS preparálás**

A gyorsfagyasztott szövetmintákból (vesekéreg, vesevelő, máj, zsírszövetek) teljes RNS-t vontunk ki TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, Amerikai Egyesült Államok) felhasználásával a gyártó útmutatása szerint (Chomczynski, 1993). A fagyott vese mintákat IKA® DI 18 basic grinder (IKA® Works do Brasil Ltd.a., Taquora, Brazília) segítségével homogenizáltuk, majd kloroform (Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) hozzáadásával vortex-el kevertük. Centrifugálással a szerves fázistól elválaszthatóvá vált vizes fázist azonos mennyiségű izopropil alkohollal szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd a precipitálódó RNS frakciót további centrifugálással üleptítettük. Az RNS pelletet ismételtén 75%-os etilalkohollal mostuk, végül 100µL molekuláris biológiai tisztaságú, Rnáz (RNS-bontó enzim) mentes vízben oldottuk fel. Az RNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000c spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Amerikai Egyesült Államok) ellenőriztük. Minden RNS minta 260 nm/280 nm-n hullámhosszon felvett fényelnyelés aránya 1.8 felett volt. Az RNS integritás ellenőrzésére 1% agaróz gélen elektroforézist végeztünk (Invitrogen Ltd., Paisley, Egyesült Királyság) BioRadWide mini-sub® cell GT rendszerben (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) és 28S riboszómális RNS csíkok arányát értékeltük. A megfelelő RNS oldatokat shock-fagyasztva további vizsgálatig -80 °C-n tároltunk.

#### **3.1.4.2. Kvantitatív, valós idejű polimeráz lánreakció (quantitative Real-Time PCR) vizsgálat**

A vesekéreg és -velő, valamint az epididimális és lágyéki fehér zsírszövet mintákban a hírvivő mRNS- (messenger RNS) és nem-kódoló, génszabályozásban résztvevő mikroRNS-ek (miRNS) szintjének meghatározásához az irodalomból vett vagy saját tervezésű illetve kitben a gyártó által biztosított primerekkel, reverz transzkripció lépést követően az enzimátikus, kettős szálú DNS (dsDNA) festésen alapuló, kvantitatív, valós idejű qRT-PCR Bio-Rad CFX96/C1000 termométer rendszert alkalmaztuk. A kvantitatív PCR reakció hatékonyságának standard görbékkel és a termék(ek) olvadáspont



vizsgálattal való ellenőrzését követően az eredményeket a relatív kvantitatív ( $\Delta\Delta Ct$ ) módszerrel számítottuk ki (Livak & Schmittgen, 2001). A relatív kvantitatív módszer ( $\Delta\Delta Ct$ ) nagy mennyiségű DNS minta és kis számú vizsgált gén expressziójának vizsgálata esetén szokásos kiértékelési eljárás. A módszer elve alapján a qRT-PCR vizsgálat során a kísérleti és kontroll csoportokból nyert mintákban különböző mRNS-ek előfordulását ( $S_q$ ) mérjük az aktuálisan vizsgált génre specifikus primerek segítségével, majd ismertén stabil (a kísérleti körülmények által nem befolyásolt kifejeződésű) ún. normalizáló gének gyakoriságához hasonlítva következtetünk a vizsgált gén relatív expressziójára. A mérés során kapott nyers adat ( $C_t$  érték, az érzékelés pillanatában megállapított ciklusszám)  $\log_2$ -on (kettes alapú logaritmuson) kifejezett érték, ami a vizsgált mRNS kezdeti mennyiségével ( $S_q$ ) arányos. Függetlenül a vizsgált géntől (normalizáló vagy változó) kísérleti (k) és kontroll (K) minták méréseit azonos qRT-PCR körülmények között szükséges elvégezni, majd ezek nyers adatának hányadosa képezhető  $\Delta kK$ . A relatív génexpresszió megállapításához feltételezeten azonos primer hatékonyság mellett a vizsgált génre (pl. TGF- $\beta$ ) és a stabil normalizáló génre (pl. Gapdh) külön-külön számolt  $\Delta kK$  értékek hányadosát vesszük (pl. TGF- $\beta$   $\Delta kK$ /Gapdh  $\Delta kK$ ), így kapjuk a  $\Delta\Delta Ct$  értéket. Mivel eddig 2-es alapú logaritmus rendszerben számoltunk, a „hányszorosán változott az expresszió? (fold-change)” kérdésre a  $\Delta\Delta Ct$  értéket a 2 negatív hatványára emelve kapjuk meg ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) a választ.

### 3.1.4.3. Fehérje-kódoló, hírvivő mRNS (messenger RNS) mérések

Első lépésként, a fent részletezett teljes RNS-t tartalmazó szöveti mintákból  $1\mu g$  mennyiséget reverz transzkripcióval (RT) komplementáris DNS (cDNS) mintává írtunk át („cDNS könyvtár”) random hexamer primerek és a nagy kapacitású cDNS Archive Kit (Applied Biosystem, Amerikai Egyesült Államok) használatával, a gyártó által javasolt protokoll szerint, a Bio Rad iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) műszer segítségével. Második lépésben, valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) során a köztes „cDNS könyvtár” mintákból célzott, specifikus primerpárok és SensiFAST SYBR® No-ROX mesterkeverék (Bioline) alkalmazásával PCR termékeket amplifikáltunk. Saját tervezésű specifikus primer-párokat használtunk: az Fwd és Rev primer szekvenciákat (ld. 1. táblázat) a tervezést az NCBI/Primer-BLAST online szoftverrel végeztük, a szintézissel az Integrated DNA Technologies (IDT, Inc., Coralville, IA, Amerikai Egyesült Államok)

céget bíztuk meg. Így a következő mRNS szinteket detektáltuk: adiponektin (Adpn), interleukin-1 béta (IL-1 $\beta$ ), leptin-receptor rövid formája (Ob-Ra), neutrofil-zselatináz asszociált lipokalin (Lcn2/NGAL), nukleáris faktor (eritroid-eredetű 2) -szerű 2 (Nrf2 vagy NFE2L2), PPAR-gamma (PPAR $\gamma$ ), tumor nekrozis faktor alfa (TNF $\alpha$ ) és transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF- $\beta$ 1). Minden mérést duplikátumban végeztünk és a relatív mRNS expressziós eredményeket vese minták esetében a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (Gapdh) mRNS, zsírszöveti minták esetében 28S rRNS szintekre normalizáltuk. Az egységes belső kontroll (housekeeping) gén használatát nem tette lehetővé az a megfigyelés, hogy az alkalmazott kezelés a zsírszövet mintákban Gapdh szintjét befolyásolta

**1. táblázat.** A qRT-PCR során használt primerek

Faj	Gén jelölés		Szekvencia (5'->3')
rno	Adpn	fwd	5'-AAAGGAGAGCCTGGAGAAGC-3'
		rev	5'-GTCCCGGAATGTTGCAGTAG-3'
rno	Gapdh	fwd	5'-AACTTGCCGTGGGTAGAG-3'
		rev	5'-ATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'
rno	IL-1 $\beta$	fwd	5'-AGA GTG TGG ATC CCA AAC AA -3'
		rev	5'-AGT CAA CTA TGT CCC GAC CA -3'
rno	Lcn2/NGAL	fwd	5'-GATGTTGTTATCCTTGAGGCCC-3'
		rev	5'-CACTGACTACGACCAGTTTGCC-3'
rno	Nrf2	fwd	5'-CTC TCT GGA GAC GGC CAT GAC T-3'
		rev	5'-CTG GGC TGG GGA CAG TGG TAG T-3'
rno	Ob-Ra/532	fwd	5'-GACGATGTTCCAAACCCCAAG-3'
		rev	5'-TGGGAGGTTGGTAGATTGGATTC-3'
rno	PPAR $\gamma$	fwd	5'-CTGCCTATGAGCACTTCACAAG-3',
		rev	5'-ATCACGGAGAGGTCCACAGA-3'
rno	TGF- $\beta$ 1	fwd	5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3'
		rev	5'-ATTCTGGCGTTACCTTGG-3'
rno	TNF $\alpha$	fwd	5'-TTCTCATTCCTGCTCGTGGC-3'
		rev	5'-AACTGATGAGAGGGAGCCCA-3'
rno	HSP90B	fwd	5'-GGAAGCCCCCGCCCTCTGTATA-3'

		rev	5'-AGGGCCAGTCAAGGCTGTTGG-3'
rno	28S	fwd	5'-GGTAAACGGCGGGAGTAACT-3'
		rev	5'-TCACCGTGCCAGACTAGAGT-3'

#### 3.1.4.4. MikroRNS-szint mérések

A mikroRNS-ek expressziós szintjét a TaqMan próba rendszer felhasználásával vizsgáltuk (Chen et al., 2011). Első lépésben 5 ng RNS mintát reverz transzkripcióval (RT) komplementáris DNS (cDNS) mintává írtunk át, miRNS-specifikus, hajtűkanyar (stem-loop) reverz transzkriptáz (RT) primerpárok (miR-21, miR-29b, miR-192, miR-200a, miR-200b, and U6 snRNA) és TaqMan® Small RNA Assays által biztosított reagensek felhasználásával (Izd. TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems). Második lépésként valós idejű polimeráz láncreakcióval (real-time qPCR) a köztes cDNS mintáinkat amplifikáltuk TaqMan® Small RNA Assay-t a TaqMan® Universal PCR Master Mix 2-t használva. Minden mérést duplikátumban végeztünk és a relatív miRNS expressziókat a U6 kis sejtmagi RNS (snRNS)-re, mint belső kontrollra normalizáltuk (Q. Liu & Nilsen-Hamilton, 1995). Mivel vizsgálatunkban az U6 expressziót a kezelés befolyásolta, a mért eredményeket az összes miRNS-mérés Sq értékének mediánjára is normalizáltuk, azonban a végeredményben ez sem fedett fel érdemleges különbséget.

### 3.2. FSGS késői stádiumának vizsgálata transzgenikus egérben

#### 3.2.1. A miR-193a-indukált transzgenikus egér modell

A vese glomerulus ECM-ának proteomikai vizsgálatát a korábban már publikált miR-193a transzgenikus egér modellen végeztük (Gebeshuber et al., 2013). Röviden, a miR-193a egér egy a tetraciklin-kontrollált transzkripció aktiváció elvét kihasználó (Izd. Tet-On;(Seibler és mtsai., 2007)) génmódosítással, eredetileg kevert (129Sv/Black6/Balb/c) genetikai háttéren létrehozott, majd a tovább tenyésztés során döntően Balb/c háttérű kondicionális modell. A genetikai módosítás miatt ivóvízzel adagolt doxiciklin miR-193a túlexpressziót indukál, ami *WT1* mester regulátor transzkripció faktor gén expresszióját elnyomva WT1 célfehérjék csökkenése következtében sejtvezérlés-elégtelenséghez vezet. Ezzel magyarázható podocita vesztés 5-10 hét alatt albuminuriával és ECM felhalmozódással járó FSGS képében végállapotú veseelégtelenségig progrediál. A genotipizálás részleteivel kapcsolatban utalok az eredeti közleményre (Gebeshuber és mtsai., 2013). Kísérleteinkhez heterozigóta, az indukció kezdetén 8-12 hetes hím állatokat használtunk. Az osztrák kollaborációban végzett kísérletekhez a helyszínt a Medical University Vienna biztosította, a kísérleti tervet és etikai szempontokat mérlegelve az

Austrian Federal Ministry of Science and Research engedélyezte (66.009/0053-II/3b/2014).

### **3.2.2. Egér vese glomerulus és ECM izolálás**

A 8 hetes indukciós időszak végén heparinos vérárvadásgátlás után ketamin-xilazin altatásban a vese glomerulusok izolálására a mágneses gyöngy módszert (Takemoto és mtsai., 2002; X. Liu és mtsai., 2013) használtuk, az alább összefoglalt kisebb saját módosításokkal kiegészítve. Az altatott állatokon középvonali thoraco-abdominalis metszésből feltártuk és lekötöttük a disztális abdominális aorta és vena cava inferiort, valamint a truncus coeliacust és arteria mesenterica superiort. Sztereomikroszkóp alatt 24G tűhöz csatlakoztatott polietilén csővel kanuláltuk a proximális abdominális aortát és mindkét vesébe jéghideg HBSS ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) oldatban szuszpendált 100  $\mu\text{L}$  ( $= 4 \times 10^7$ ) Dynabeads M-450 Tosylactivated (Invitrogen/Life Technologies AS, Oslo, Norway) mágnes gyöngyöt fecskendeztünk. Az elfolyást a disztálisan lekötött vena cava inferioron (VCI) ejtett bemetszéssel biztosítottuk. A módszer elve szerint a mágnesgyöngyök a glomerulus kapilláris átmérőjéhez hasonló méretük miatt ott elakadnak, és az így mágnesessé vált glomerulusok kivonása, az ezt követő mechanikus és enzimátikus kezelés során lehetővé válik a veseszövet más részeinek eltávolításával. Ezt követően az alkotóelemeire bontott mintában a szakirodalomból vett, többlépcsős eljárással dúsítottuk a glomeruláris ECM fehérje komponenseit (Randles és mtsai., 2015).

### **3.2.3. Glomeruláris ECM előkészítése tömegspektrometriai analízisre**

A tömegspektrometriai analízisben a University of Veterinary Medicine Vienna, Vetcore Facility for Research munkatársaink voltak segítségünkre. A glomeruláris ECM minta előállítását követően a mágnesgyöngyözött fehérjét 10  $\mu\text{L}$  50 mM TRIS (pH 8.0) oldatban reszuszpendálták, majd további 10  $\mu\text{L}$  térfogatban 8M urea hozzáadásával (végtérfogat 20  $\mu\text{L}$ ) 37 °C-n, 30 percig tartó DTT redukciót, illetve 25 °C-n, 30 percig tartó jódiacetamid alkiláló lépést követően Tripszin/LysC (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)-vel „oldatban történő emésztést” (in-solution digestion) végeztek. A LysC emésztés 37 °C-n 4 órán át tartott, ezután a tripszin emésztés érdekében az urea koncentrációt 140  $\mu\text{L}$  50mM TRIS (pH 8.0) hozzáadásával csökkentették és az inkubációt 37 °C-n további 8 órán át folytatták, majd az emésztést 0,8  $\mu\text{L}$  tömény trifluoro-ecetsavval (TFA) állították le. A peptid mintából a mágnesgyöngyöket mágnessel eltávolították, majd mintát C18 oszlopokra vitték fel (Millipore Ziptips C18,

Pierce Micro-Spin Columns, Pierce Biotechnology/Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA) a HPLC-MS/MS tömegspektrometriai analízishez.

### 3.2.4. Nano-HPLC/Hybrid Quadrupole–Orbitrap Tömegspektrometria

A mintát alkotó fehérjék azonosítását és kvantifikálását nagy felbontású ún. Hybrid Quadrupole–Orbitrap tömegspektrométer (QExactive HF, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) műszerrel végezték. A peptidek szeparálása nano-HPLC Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Sunnyvale, California, USA) rendszerrel történt, mely az MS-hez nano-electrospray ionforrás útján direkt kapcsolódott. Az <sup>1</sup>LC–MS rendszert az Xcalibur 4.1.31.9 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) üzemeltette. A vizsgálat részleteit illetően utalok a megjelent közleményünkben olvasható részletekre (Bukosza és mtsai., 2020).

### 3.2.5. LC-MS adat feldolgozás fehérje azonosítás és kvantifikáció

A tömegspektrometriai analízis során gyűjtött nyers adatok elemzését a gyártó által biztosított specifikus azonosítási és kvantifikációs szoftverrel végeztük (Proteome Discoverer szoftver, 2.2.0.388 verzió, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Az adatbázis az UniProt által regisztrált *Mus musculus* (taxonomy id: 10090) fehérjéket és a cRAP (common Repository of Adventitious Proteins: <ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP/crap.fasta>) által ismert fehérjéket tartalmazta. Az adatbázis keresés során alkalmazott paramétereket az előkezeléshez (tripszin emésztés, a cisztein diszulfidhidak alkilálása) illesztettük, tehát az azonosításkor megengedően figyelembe vettünk olyan dinamikus fehérje módosulásokat, mint a metioninon-történt

---

<sup>1</sup> A mintákat 25 cm-es Acclaim PepMap C18 oszloppal – (75 µm belső átmérő, 3 µm részecskeméret, 100 Å pórusátmérő) koncentrálták és só-mentesítették. A grádiens 4% B (80% acetonitril (ACN), 0,08% hangyasav reagens)-ről kezdve 60 perc alatt 31% B-ig, majd a következő 5 percen 44% B-ig emelték, majd egy 95% B-s mosási lépés követett. A mobil fázis a 0,1% hangyasavat tartalmazó LC–MS tisztaságú H<sub>2</sub>O volt. A tömegspektrometriai analízis eseményfüggő adatgyűjtéssel (data-dependent acquisition (DDA)) folyt, a mérés a nagy felbontású, ún. Q Exactive HF Orbitrap tömegspektrométerrel történt, amelyhez a folyadék kromatográfiás elem egy nano-elektrospray ionforrás útján direkt kapcsolódott. A tömegspektrometriai teljes scan (full scan) regisztrátumokat az ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer a 350–2000 m/z tartományban, 60,000 felbontással végezte, maximális befecskendezési idő 50 ms és az automatic gain control (AGC) 3e<sup>6</sup> beállítások mellett. A 10 legnagyobb intenzitású ion az Orbitrap rendszerben nagy energiájú ütközés disszociációs (high energy collision dissociation, HCD) aktivációval további fragmentáció történt m/z 200 és 2000 tömegspektrum tartományban 15,000 felbontás és 4e<sup>4</sup> intenzitás határérték mellett. Az +1, +7, +8, és >+8 töltésű ionok kizárásra kerültek. A normalizált kollíziós energiát (NCE) 28-ra állítottuk. Minden esetben AGC=5e<sup>4</sup> és maximális befecskendezési idő=50 ms beállítást alkalmaztunk. Az ismétlődő csúcs fragmentálódás elkerülése érdekében a dinamikus prekursor ion tömeg kizárás időablaka 30s volt. Az ismételt csúcs-fragmentáció elnyomására egy 30 másodperces időablakon át a prekursor ion tömegének dinamikus kizárását végeztük.

oxidáció és az N-terminális acetiláció. Tömeg tolerancia 10 ppm és a rész tömeg tolerancia 0.02 Da volt. A hibás felismerési arányt (false discovery rate (FDR)) peptide spectrum match (PSM) szinten az integrált szoftver eszközökkel <1%-ra állítottuk be és egy fehérje azonosításához legalább 2 peptid alkotóelem azonosítását határoztuk meg minimum feltételként. A kvantifikációhoz DDA-Orbitrap rendszerrel gyűjtött nyers adatok feldolgozása a Proteome Discoverer-rel, a nyers adatok normalizálása azonos peptid mennyiségre történt. A biológiai minta adott értékét a technikai replikátumok mért értékeinek mediánja adta. A kísérletterv alapján a statisztikai analízis ú.n. „nem egymásba ágyazott” (non-nested) megközelítésben, a két csoport (kontroll vs. miR-193a), négy-négy független biológiai replikátumát figyelembe véve, a normalizált értékek páros összehasonlításán alapult. A peptid csoport arányokat a Proteome Discoverer szoftverben az összes replikátum (miR-193a/ctrl) összes lehetséges kombinációjának geometriai mediánja adta, majd a fehérje arányokat a peptid csoport arányok geometriai mediánja határozta meg. A p-értékeket Benjamini–Hochberg módszerrel állapítottuk meg. A fehérje koncentráció változást statisztikailag szignifikánsnak értékeltük, amennyiben a FDR-illesztett p-érték 0,05-nél alacsonyabb és a változás minimum kétszeres volt (fold change < -2 or > +2), valamint fehérjénként minimum 1 unikális és legalább két teljes peptidet tudtunk azonosítani.

### 3.2.6. MRNS adatelemzés egér és humán FSGS glomeruláris mintákon

A felismert ECM-asszociált gének listájának olyan génekkel való bővítése érdekében, amelyeket a tömegspektrometria alapú analízissel nem lehetett kimutatni, miR-193a-indukált egér és humán FSGS glomerulusokban legalább háromszoros mértékben megváltozott (csökkent vagy növekedett) kifejeződésű géneket kerestünk mRNS szintű vizsgálatokban azonosított gének összehasonlításával. Az ECM-kapcsolatot a Matrisome forrás adatbázis (Naba és mtsai., 2012) és PubMed kereséssel határoztuk meg. Részletesebb humán adatok egy korábbi, 4 idiopathiás FSGS és 4 kontroll mintát összehasonlító publikációban álltak rendelkezésre (Bennett és mtsai., 2007). Idézem: a 4 humán FSGS minta 17-29 év közötti életkorú, nő nemű, 2 kaukázusi és 2 afroamerikai etnikumú páciensből származott, kontroll csoportként (n=3) 4 évnél idősebb életkorú páciensektől származó, Wilms' tumor miatt eltávolított vesék ép régióiból vett minta szolgált. A vastagtű biopsziás minták 2-15 db értékelhető glomerulust tartalmaztak. Az

FSGS-páciensek vizelet fehérje ürítése 4,0; 5,4; 14,7; és 17,0 (g/24h) a szérum kreatinin szintje 0,8; 1,1; 0,9; és 5,3 (mg/dL) volt.

### **3.3. Hisztomorfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok egér és patkány vese mintákon**

Rutin morfológiai vizsgálatokat formalin-fixált paraffinba ágyazott szövettani metszeteken standardizált protokoll szerint, perjódsvav-Schiff (PAS) és savas fukszin narancs G (SFOG) festésekkel végeztünk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz *az elhízott, prediabéteszes patkány kísérletben* anti-kollagén IV (AB-756P, EMD Millipore, Burlington, Massachusetts, Egyesült Államok), anti-desmin (MS 376-S1, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); anti-alfa simaizom aktin (anti- $\alpha$ SMA; ab5694, Abcam, Cambridge, Nagy-Britannia) és anti-fibronektin (anti-FN; HPA0027066, Atlas Antibodies, Bromma, Svédország) poliklonális antitestet, a *miR-193a transzgenikus egér kísérletben* anti-kollagén I (ab34710; Abcam, Cambridge, Nagy-Britannia) és anti-fibrinogén/fibrin (Dako A0080; Agilent, Santa Clara, California, Egyesült Államok) antitesteket alkalmaztuk, 1:1000 koncentrációban, a gyártó útmutatása szerint. Mindkét kísérlet sorozatban az immunhisztokémiai vizsgálatot az avidin–biotin módszerrel folytattuk és diaminobenzidin (DAB) előhívással fejeztük be. A szövettani metszetek digitalizálásához a Zeiss AxioCam 512 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) rendszert használtuk. A további adatfeldolgozás során a glomeruláris érgomolyag határának szabadkézi kijelölését követően a standard glomerulus nagyság paraméterek (pl. Feret átmérő) és a PAS, illetve az immunmetszeteken (kollagén I, kollagén IV, fibrinogén, dezmin,  $\alpha$ SMA és FN) pozitívnak értékelt területek automatizált meghatározásában a Cell profiler szoftver (Carpenter Lab, Broad Institute of Harvard & MIT, Cambridge, Massachusetts, Egyesült Államok) volt a segítségünkre.

### **3.4. Statisztikai módszerek**

Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) formában mutatjuk be. Ahol a Bartlett-teszt a varianciák inhomogenitását jelezte logaritmikus transzformációt hajtottunk végre. A folyamatos változókat (testtömeg, plazma és zsírszöveti paraméterek, albuminuria, szövettani kiértékelésnél pozitív festődés területe) kétmintás Student's t-próbával hasonlítottuk össze. A több csoportban végzett folyamatos változó értékelésére a kétszemponos ANOVA módszert Tukey-féle utólagos, többszörös összehasonlítással



kiegészítve használtuk (mRNS-, miRNS-expresszió eredmények). A testtömeg-növekedést kétszemponos, ismétléses ANOVA (2-way RM ANOVA) és Sidak post hoc teszt alkalmazásával elemeztük. A **11. ábra** elkészítéséhez az Ingenuity Pathway Analysis szoftver elemzésében szereplő ábrát vettük át. Mindkét kísérletben elutasítottuk a nullhipotézist, ha a p érték elérte a statisztikai 0.05 szignifikancia szintet (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

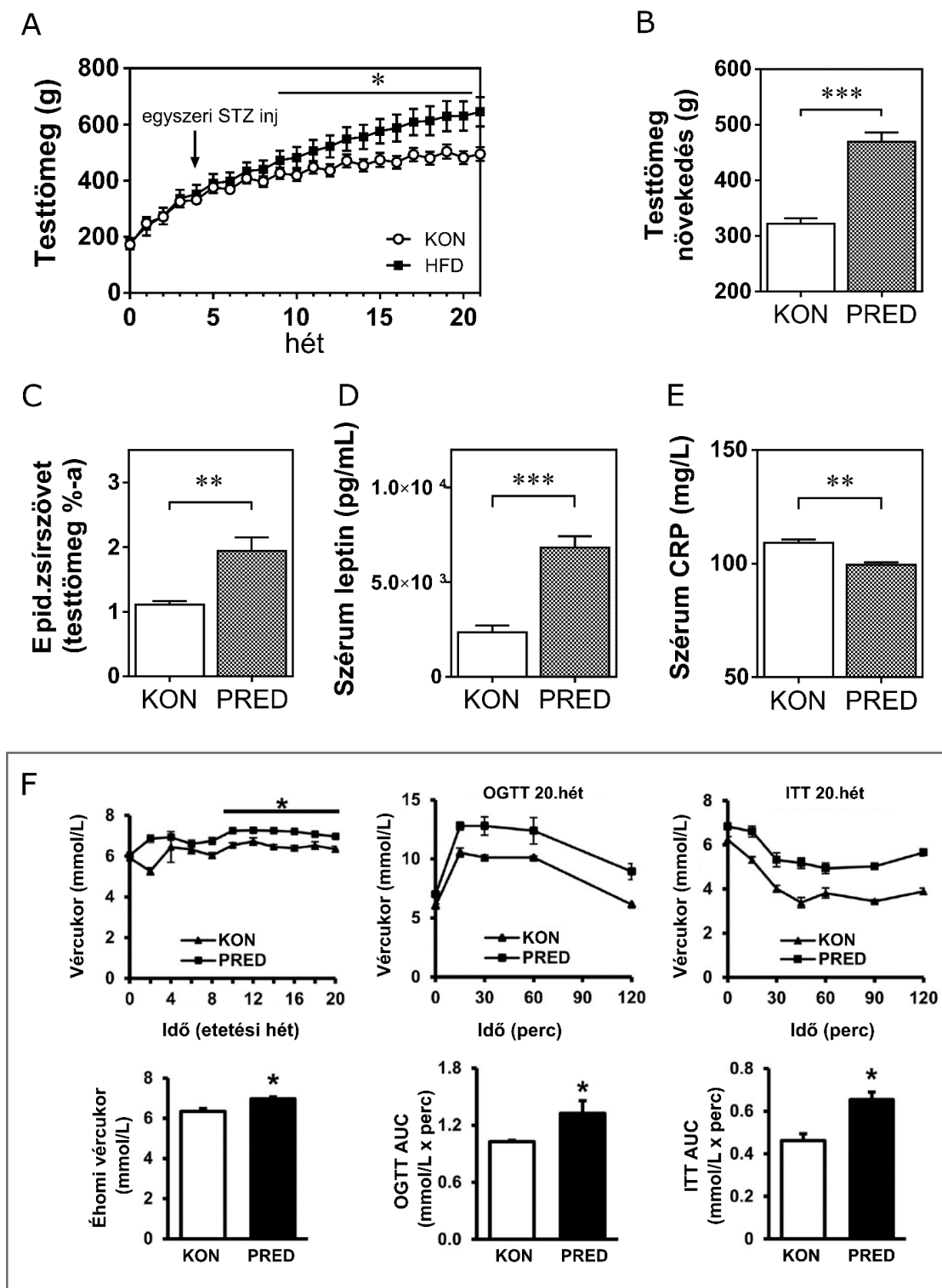
Mindkét tanulmányban az adatkezeléshez, a statisztikai elemzéshez és vizuális reprezentációhoz, az ábrák készítéséhez a GraphPad Prism6 szoftvert (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA) használtuk.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Az obez, prediabéteszes Long-Evans patkány, mint korai ORG modell**

#### **4.1.1. A HFD-STZ indukált Long-Evans patkányokban az elhízás, a prediabétesz és a zsírszöveti átépülés ellenére a májfunkció megtartott maradt**

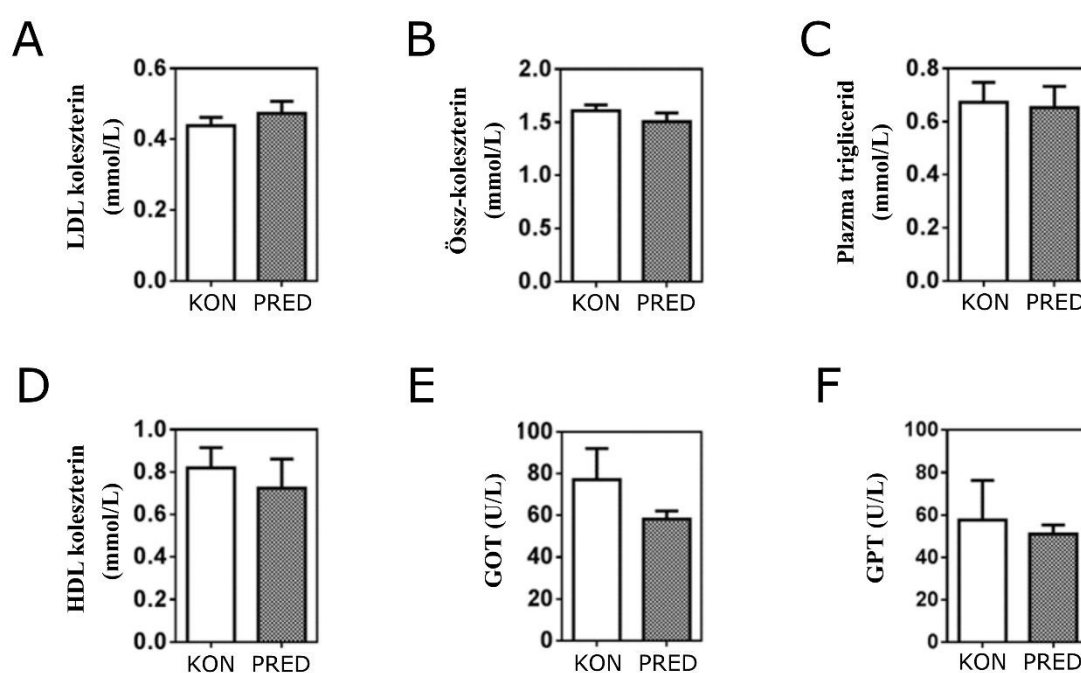
A 20 hetes követési időszak alatt a testtömeg mindkét csoportban nőtt, azonban a 9. héttől a PRED állatok a testtömege és a vizsgálat kezdetéhez képest elért testtömeg emelkedés is szignifikánsan nagyobb volt, mint a KON csoportban. A két csoport közötti testtömeg különbség a 20. héten elérte a 46 %-ot (**2. ábra A-B**). A 21. héten a relatív epididimális zsírszövet tömeg és a plazma leptin szint szignifikánsan magasabb volt (**2. ábra C-D**), miközben, meglepő módon, a plazma CRP koncentrációja alacsonyabbnak bizonyult a PRED, mint a KON csoportban (**2. ábra E**).



**2. ábra.** Testtömeg, plazma és zsírszöveti paraméterek a vizsgálat végén (A) A testtömeg növekedés üteme és (B) a relatív testtömeg növekedés (vizsgálat kezdeti és végi testtömeg közti különbség) a két csoportban, (C) az epididimális zsírszövet tömege, (D) a plazma leptin és (E) a plazma CRP koncentrációk, (F) (Koncsos és mtsai engedélyével átvéve) glükóz anyagcsere jellemzése: vércukorszint monitorozás illetve éhomi vércukor szint,

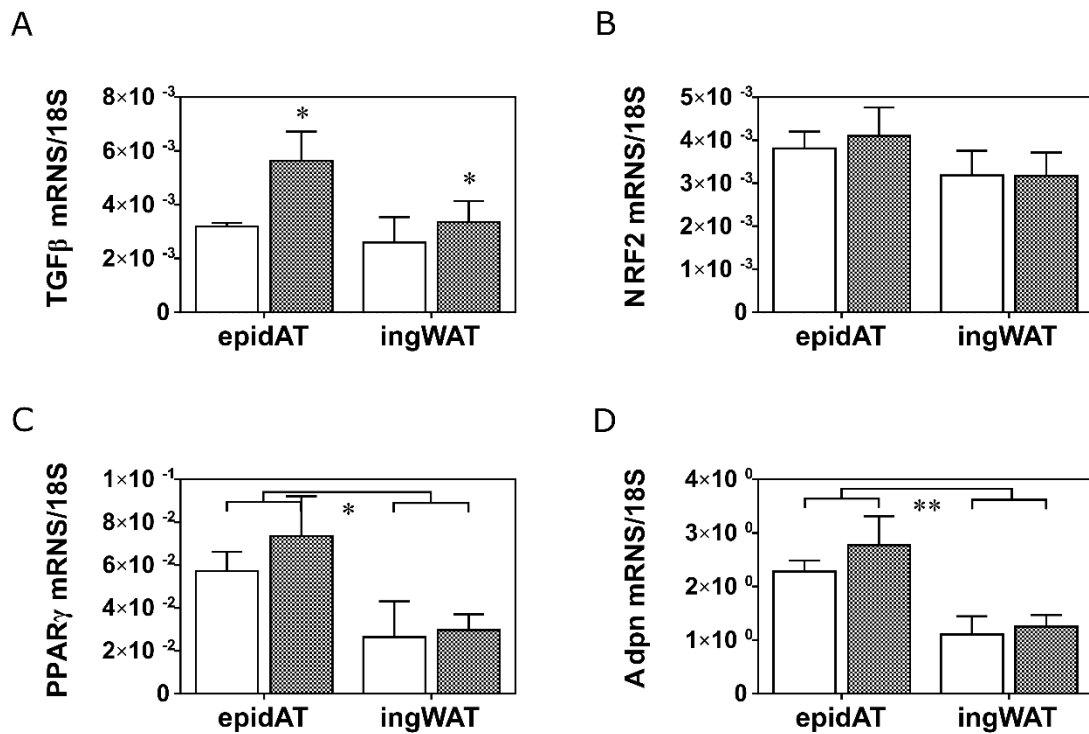
orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) és inzulin tolerancia teszt (ITT) a 20. etetési héten obese, prediabéteszes (PRED, szürke oszlop) és kontroll (KON, fehér oszlop) patkányokban. Adatok: átlag  $\pm$  SEM,  $n \geq 8$ /csoport. Kétszemponos, ismétléses ANOVA, Sidak-féle post hoc teszt (A) és kétmintás t-próba (B-E); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ .

A plazma koleszterin, triglicerid, alacsony denzitású lipoprotein (LDL) és magas denzitású lipoprotein (HDL) koncentrációk hasonlóak voltak a két csoportban (3. ábra A-D). Ezen kívül a két csoportban nem találtunk különbséget a májenzimek (GOT, GPT) plazma koncentrációjában sem (3. ábra E-F).



**3. ábra.** Plazma lipid koncentrációk és májenzimek. (A) LDL koleszterin (mmol/L), (B) összkoleszterin (mmol/L), (C) plazma triglicerid (mmol/L), (D) HDL koleszterin (mmol/L), (E), glutamát-oxaloacetát-transzamináz (GOT; U/L) and (F) glutamát-piruvát-transzamináz (GPT; U/L) koncentrációk obese, prediabéteszes (PRED, szürke oszlop) és kontroll (KON, fehér oszlop) patkányokban a vizsgálat végén. Adatok: átlag  $\pm$  SEM,  $n=11$ /csoport, kétmintás t-próba.

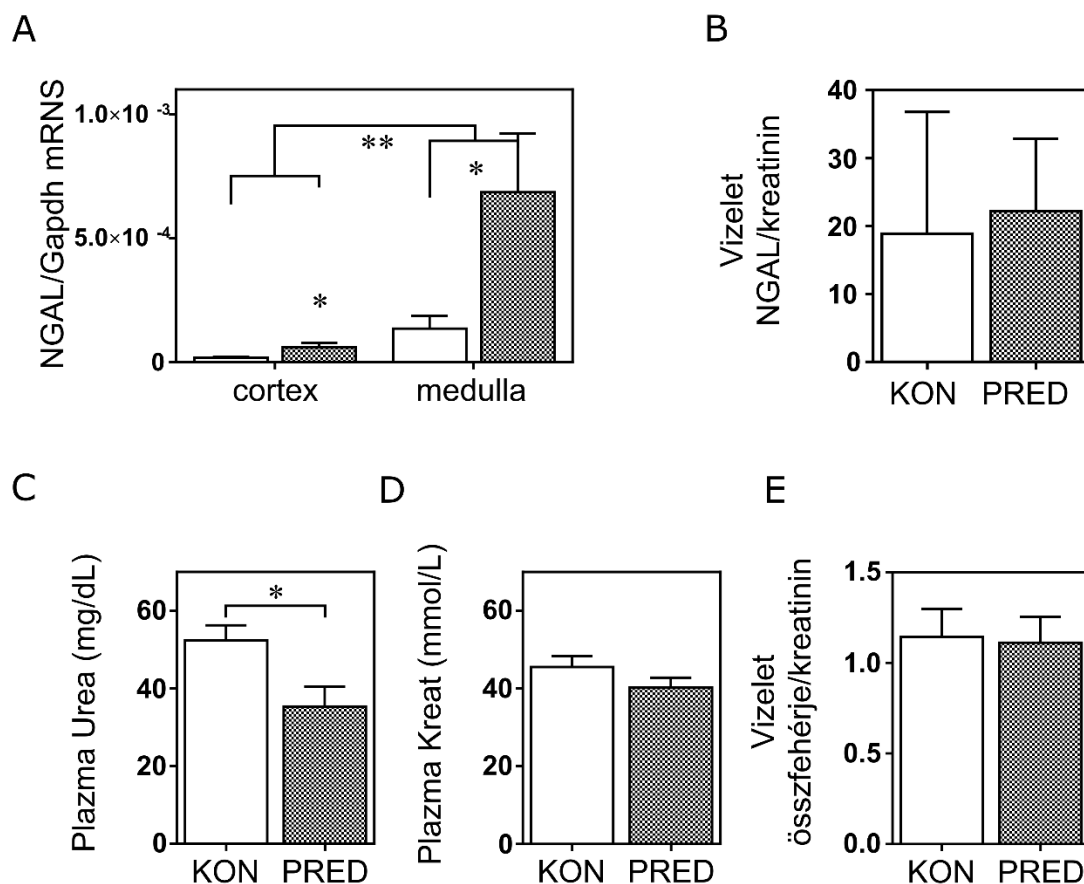
A TGF- $\beta$ 1 mRNS expressziója az epididimális és a lágyéki zsírszövetben egyaránt magasabb volt PRED, mint a KON állatokban (4. ábra A). Másfelől, a Nrf2, a PPAR $\gamma$  és az Adpn mRNS expressziója nem különbözött a két csoportban (4. ábra B-D). A PPAR $\gamma$  és az Adpn mRNS expressziója magasabb volt az epididimális, mint az lágyéki fehér zsírszövetben (4. ábra C-D).



**4. ábra.** A zsírszöveti átépülés gén-expressziós jelzői (A) TGF-β1, (B) Nrf2, (C) PPARγ és (D) Adpn mRNA expresszió epididimális (epidAT) és lágyéki, fehér (ingWAT) zsírszövetben obese, prediabéteszes (PRED, szürke oszlop) és kontroll (KON, fehér oszlop) patkányokban a vizsgálat végén. Adatok: átlag ± SEM, n≥8/csoport, kétszemponos ismétléses ANOVA; \*: p<0,05, \*\*:p<0,01; \*\*\*: p<0,0001.

#### 4.1.2. Az obese, prediabéteszes patkányokban megtartott vesefunkció mellett szignifikáns kollagén lerakódás és tubuláris Lcn2 expresszió jelent meg

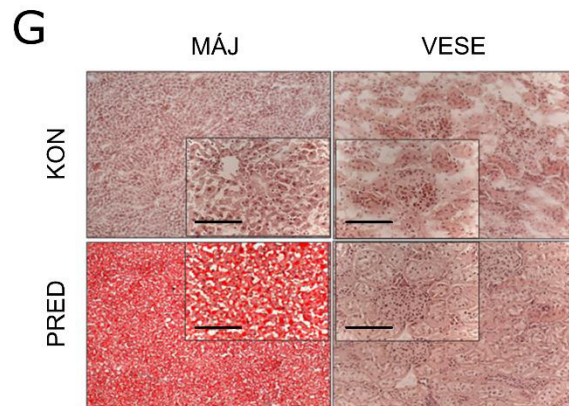
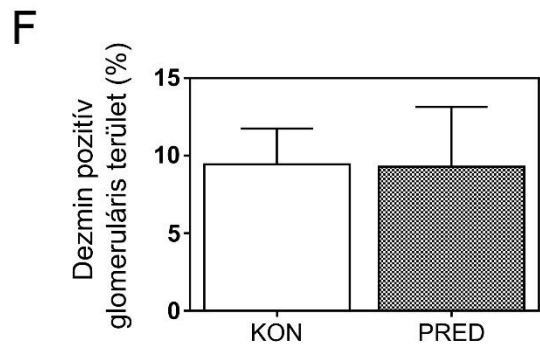
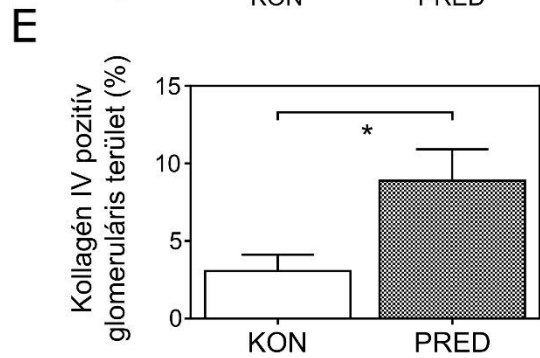
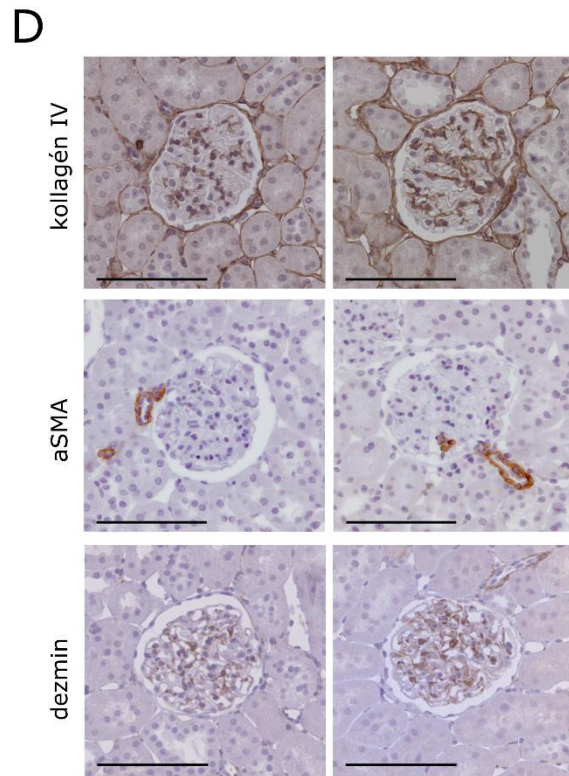
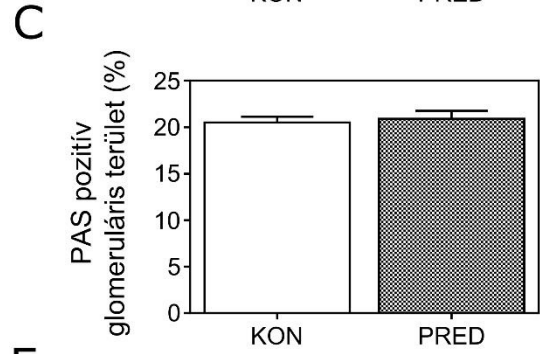
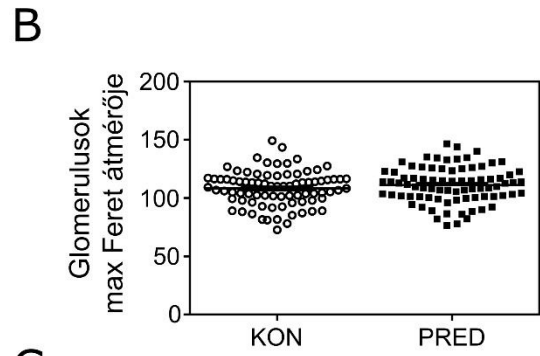
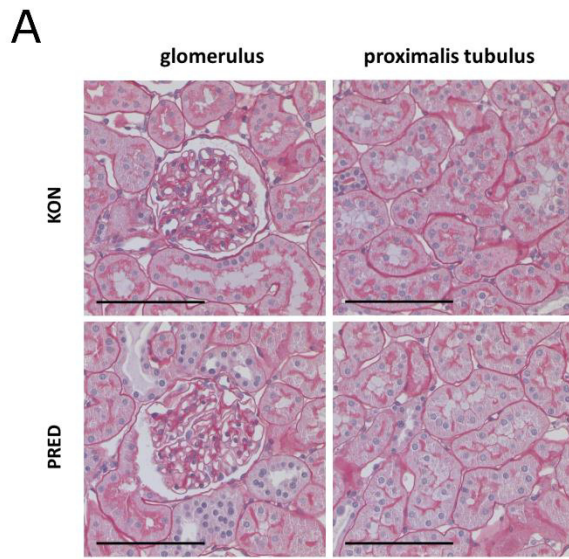
A PRED patkányokban az elhízás és a hiperleptinémia ellenére a vesefunkció (plazma kreatinin-szint és fehérje ürítés) érintetlen volt. Az Lcn2 (NGAL) mRNA expresszió (vesekárosodás marker) szintje 7,5-szeres és 11,3-szoros emelkedést mutatott a vesevelőben (medulla) és a vesekéregben (cortex) PRED-ben a KON csoporthoz képest (**5. ábra A**), ugyanakkor a vizelet Lcn2 (NGAL) ürítése hasonló volt a két csoportban (**5. ábra B**). A plazma karbamid-urea koncentráció mindkét csoportban a normál tartományban volt, de szignifikánsan alacsonyabb értéket észleltünk a PRED, mint a KON csoportban (**5. ábra C**). A plazma kreatinin koncentráció (**5. ábra D**) és a vizeletfehérje (**5. ábra E**) hasonló volt a PRED és a KON patkányokban.



**5. ábra.** Vesefunkció és vesekárosodás paraméterek a vizsgálat végén. (A) Lcn2 (NGAL) mRNA expresszió a vesekéregben és a vesevelőben, (B) vizelet NGAL ürítés, (C) plazma karbamid-urea (mg/dL) and (D) plazma kreatinin koncentrációk (mmol/L) és (E) a vizelet fehérjeürítés obez, prediabeteszes (PRED, szürke oszlop) és kontroll (KON, fehér oszlop) patkányokban a vizsgálat végén. Adatok: átlag ± SEM,  $n \geq 7$ /csoport. kétszemponyos ismétléses ANOVA; kétmintás t-próba (B-E); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

A PAS-sal festett metszetek szövettani értékelése során intakt vesemorfológiát észleltünk mind PRED, mind KON patkányokban (6. ábra A). A glomerulusok maximális Feret átmérőjének átlaga hasonló volt a két csoportban, ami a glomeruláris hipertrófia lehetőségét egyértelműen kizárta a PRED állatokban (6. ábra B). A glomeruláris érgomolyag relatív PAS pozitív területei kiterjedésének vizsgálata nem jelzett patológiás ECM felhalmozódást a PRED állatok glomerulusaiban a KON állatokkal összehasonlítva (6. ábra C). A proximális tubuláris hámsejtek kefeszegélye normálisnak mutatkozott, inverz vakuoláris festés nem volt tetten érhető. Az olajvörös O festés, a lipid felhalmozódás specifikus markere, negatív eredményt adott mind a KON, mind a PRED csoport vesemintáin, annak ellenére, hogy a PRED állatok májában jelentős lipid

felhalmozódást jelzett (**6. ábra G**). Kollagén IV specifikus immunfestéssel a strukturális fehérje szignifikánsan megnövekedett mennyiségét észleltük a PRED patkányok glomerulusaiban a KON csoporthoz képest (**6. ábra D-E**). A mezangiális sejt differenciáció és aktiváció marker, az  $\alpha$ SMA fehérje jelenléte a glomerulusban egyik csoportban sem volt érdemben detektálható, a podocita stressz indikátor dezmin fehérje expressziója pedig a két csoportban hasonlóképpen jelentéktelennek tűnt, és nem volt magasabb PRED csoportban KON-hoz képest (**6. ábra D, F**).



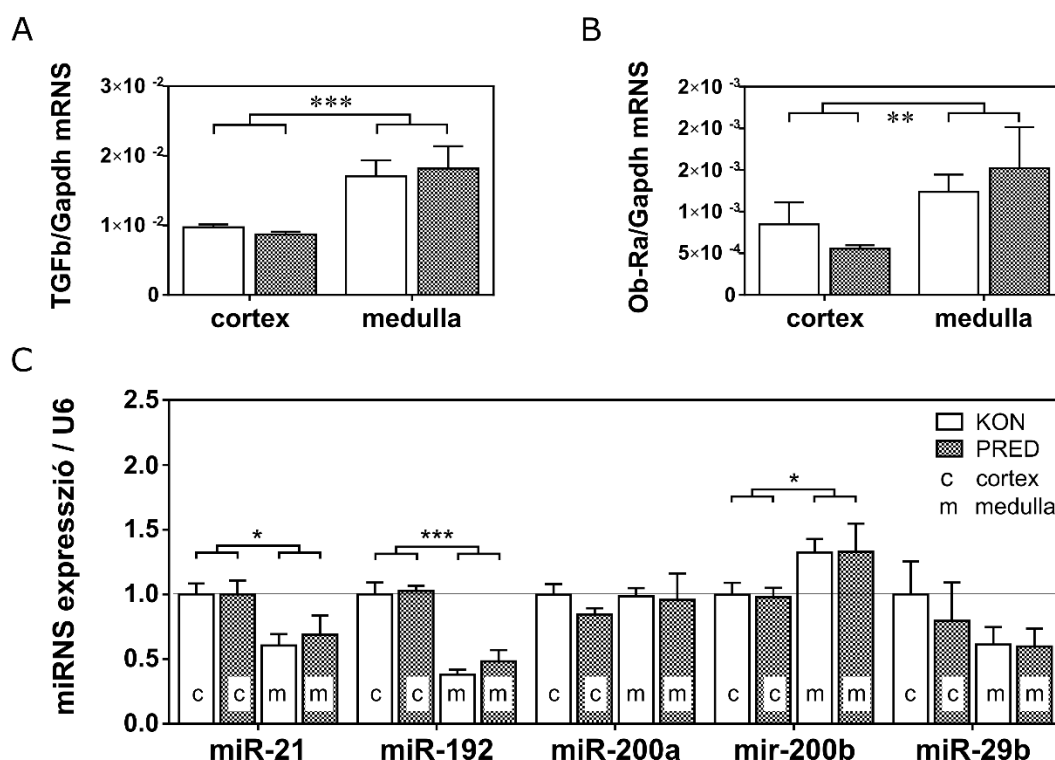


**6. ábra.** Vese szövettan és immunhisztokémia kontroll és obez, prediabetészes patkányban. (A) A reprezentatív felvételek FM-perjódsv-Schiff (PAS) reakciójú glomerulusokat (bal) és proximális tubulusokat (jobb) mutatnak, KON (fent) és PRED patkányokban (lent). (B) A glomerulus méretét jellemző legnagyobb Feret átmérő; (C) a PAS pozitív terület a teljes glomeruláris érgomoly-felszín arányában kifejezve. (D) Reprezentatív felvételek kollagén IV, alfa-simaizom aktin ( $\alpha$ SMA) és dezmin immunfestés glomerulusokban; (E) a glomeruláris érgomolyag relatív kollagén IV pozitív és (F) dezmin pozitív területe kontroll (KON, bal) és prediabetészes (PRED, jobb) patkányokban. (G) A reprezentatív felvételek FM- olajvörös festéssel kontroll (KON, felső sor) és prediabetészes (PRED, alsó sor) máj (bal) és veseszöveti (jobb) mintákon. A felvételek 200x nagyítással készültek; lépték =100  $\mu$ m; Adatok: átlag  $\pm$  SEM, n=9 minta/csoport, minden adatpont 20 glomerulus/minta átlagát mutatja. Kétmintás t-próba (B, C, E, F); \*: p<0,05.

#### **4.1.3. A vesefibrózis ismert mRNS és miRNS markere nem változtak a PRED patkányokban**

A TGF- $\beta$ 1 (**7. ábra A**) és az Ob-Ra (**7. ábra B**) azonos mértékben expresszálódott a PRED és a KON vesékben. Ugyanakkor, szignifikáns medulláris túlsúlyt észleltünk mindkét mRNS esetében az étrendtől függetlenül.

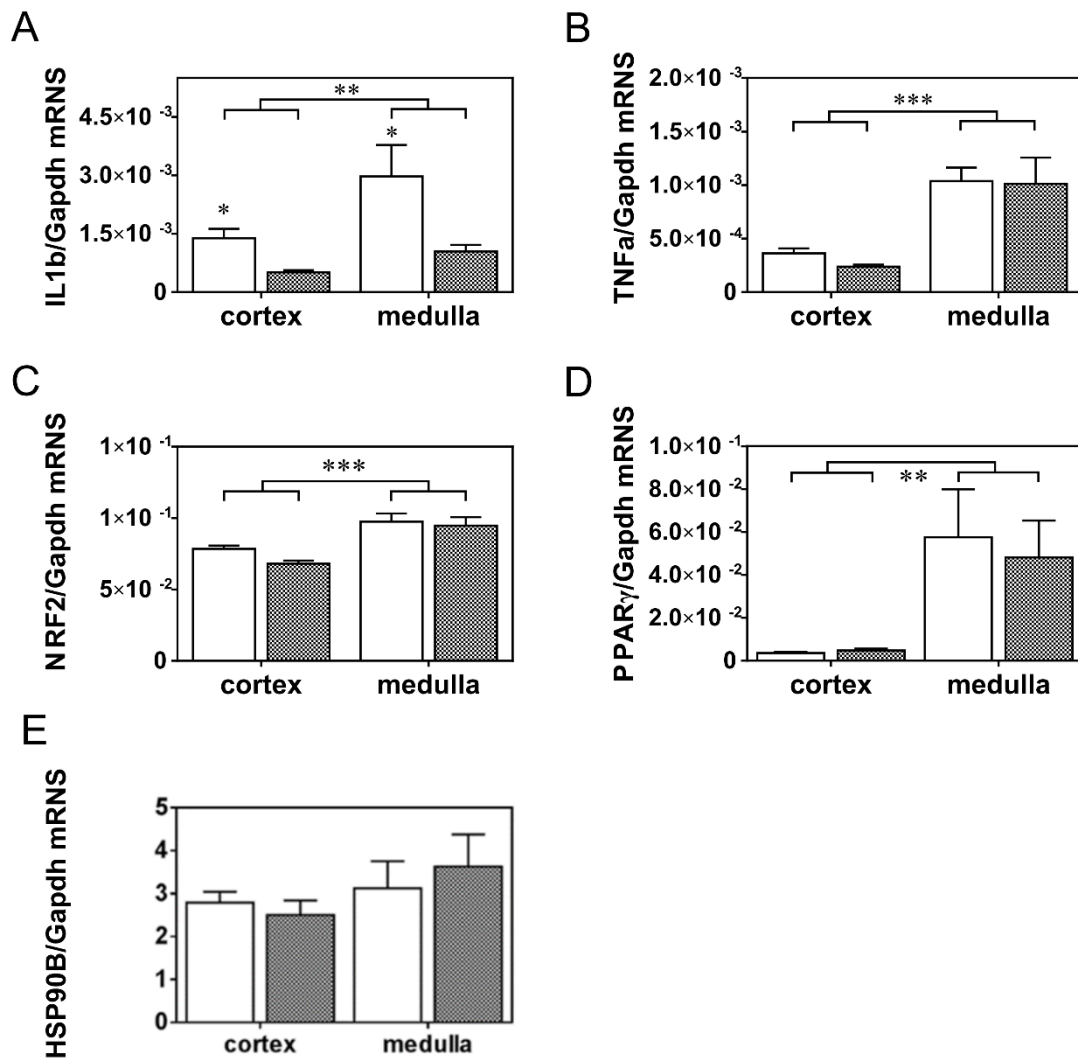
A gyulladással és a fibrózissal összefüggésbe hozható mikroRNS-ek (miR-21, miR-29b, miR-192, miR-200a, miR-200b) expresszióját a PRED nem befolyásolta szignifikánsan a vesében a KON csoporthoz képest. Ugyanakkor a táplálástól függetlenül, az expresszió lokalizációjában szignifikáns különbségek voltak, a vesekéregben a medullához képest magasabb a miR-21, miR-192 és alacsonyabb miR-200b expressziót detektáltunk (**7. ábra C**).



**7. ábra.** Vesefibrózis mRNA and miRNA markerei a vizsgálat végén. (A) TGF- $\beta$ 1 mRNA, (B) leptin-receptor rövid izoformájának (Ob-Ra) mRNA expressziója és (C) a vesefibrózisra jellemző mikroRNA-k (miR-21, miR-192, miR-200a, miR-200b and miR-29b) expressziója vesekéregben (cortex (c)) és a vesevelőben (medulla (m)) obez, prediabéteszes (PRED, szürke oszlop) és kontroll (KON, fehér oszlop) patkányokban. Adatok: átlag  $\pm$  SEM, (A-B)  $n=8-9$ /csoport, (C)  $n \geq 4$ /csoport, a miRNA-k expresszióját a kontroll (KON) csoport vesekéreg expressziójának arányában kifejezve adjuk meg. Kétszemponyos ismétléses ANOVA \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.4. A gyulladás, oxidatív stressz és metabolizmus markereinek mRNA expressziója obez, prediabéteszes patkányok veséiben változatlan

Meglepetésünkre, az IL-1 $\beta$  mRNA expresszióját jelentősen kisebbnek találtuk a PRED csoportban a KON-hoz képest, mind a vesekéregben, mind a medullában (**8. ábra A**) míg a TNF $\alpha$  mRNA expressziója a vesekéregben (kb. 40%-kal) szintén csökkenni mutatott, ez utóbbi változás azonban nem volt szignifikáns (**8. ábra B**). Az Nrf2, PPAR $\gamma$  és HSP90 $\beta$  mRNA expresszióját (**8. ábra C-E**) a prediabétesz nem befolyásolta. A gyulladás (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), az oxidatív stressz (Nrf2) és az anyagcsere zavar (PPAR $\gamma$ ) marker génei mindegyikének expressziója jellemzően magasabb volt a vesevelőben, mint a kéregben (**8. ábra A-E**).



**8. ábra.** Gyulladás, oxidatív stressz és metabolizmus markereinek mRNA expressziója a vesében a vizsgálat végén. (A) IL-1 $\beta$ , (B) TNF $\alpha$ , (C) Nrf2, (D) PPAR $\gamma$  és (E) HSP90B mRNA expresszió vesekéregben (cortex (c)) és vesevelőben (medulla (m)) obesez, prediabéteszes (PRED, szürke oszlop) és kontroll (KON, fehér oszlop) patkányokban. Adatok: átlag  $\pm$  SEM, kétszemponos ismétléses ANOVA, n: 8-9/csoport (A-E); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ .

## 4.2. A glomeruláris ECM összetétele miR-193a-indukált késői FSGS-ben

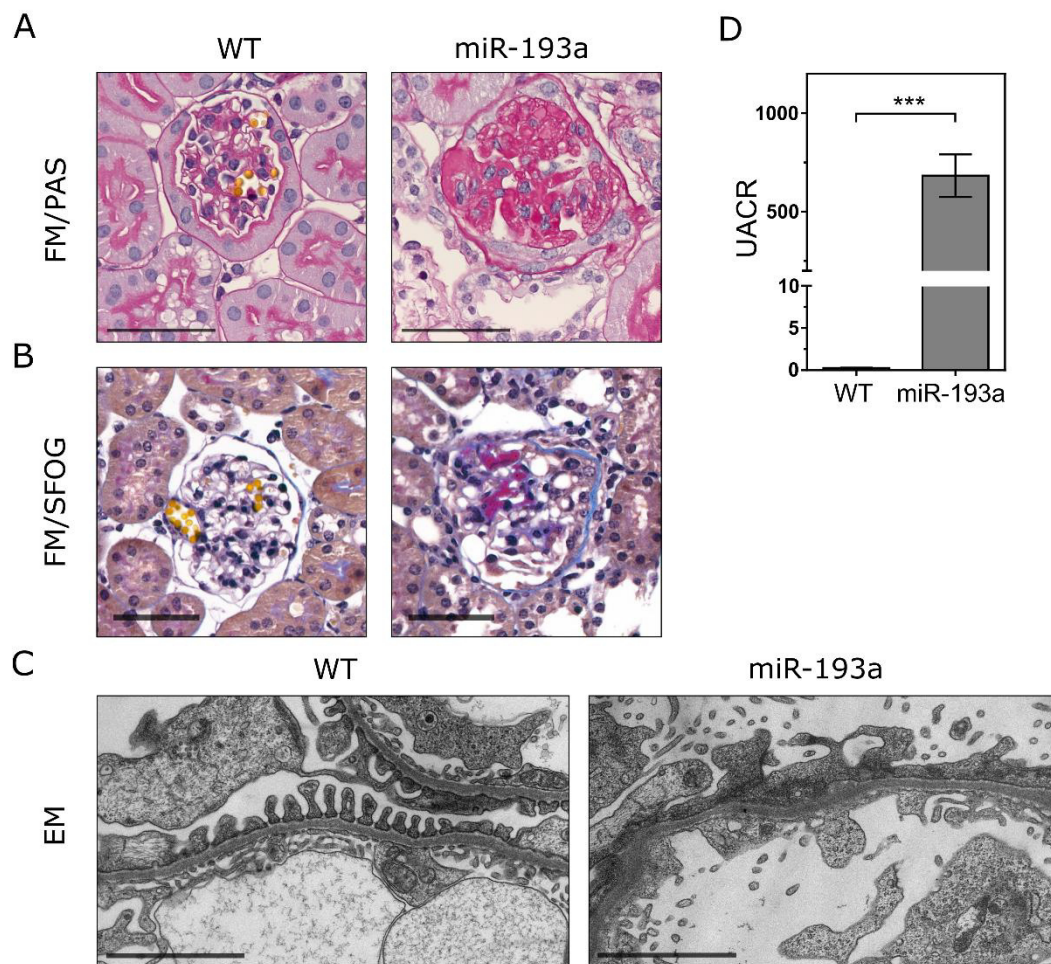
### 4.2.1. Előrehaladott FSGS morfológiai és funkcionális jelei 8-hetes miR-193a-indukciót követően

Ebben a kísérletsorozatban az egészségeshez képest a primer FSGS transzgenikus állatmodelljét vizsgálva a veseglomerulus patológiás ECM összetétel változására fókuszáltunk. A tetraciklin-kontrollált transzkripció aktiváció elvét kihasználó (Tet-On típusú) genetikailag módosított modellünkben nyolc héten át ivóvízben biztosított doxiciklin-adagolással miR-193a-túexpresszióját indukáltuk, mely a kísérleti csoportban primer FSGS klinikai kórképét hozta létre. Az azonos életkorú egészséges kontroll állatokhoz képest jelentős proteinuriát, makroszkópos és szövettani eltéréseket észleltünk (**9. ábra**). A rutin szövettan előrehaladott fokális szegmentális glomeruloszklerózist, glomerulomegaliát, a glomeruláris mátrixban PAS-pozitív anyag felhalmozódását, intrakapilláris kasztok megjelenését igazolta (**9. ábra A-B**). Az EM podocita álláb leválást és fúziót, a GBM kiszélesedését és ultrastrukturális eltéréseket mutatott (**9. ábra C**). A kreatinin ürítésre normalizált vizelet fehérjeürítés nefrózis szindrómának megfelelő mértékű proteinuriát (fehérjevizelet) igazolt (**9. ábra D**).

### 4.2.2. Akut fázis válasz, komplement alkotók, fibrinogén és szerin proteázok

Az egészséges kontroll és 8 hetes miR-193a-túexpresszió hatására FSGS-indukált egerek glomerulusát feldolgozva ECM fehérje mintákat nyertünk, a Rachel Lennon és munkatársai által bevezetett módszer adaptálásával, majd csoportonként 4-4 minta összetételét tömegspektrometriai analízissel (HPLC–MS) vizsgáltunk. A HPLC–MS vizsgálat legalább 2 peptid fragmentum detektálása alapján 1593 fehérje jelenlétét azonosította a mintáinkban (a részletes felsorolás a dolgozat kereteit meghaladja, ezért utalok a témában megjelent közleményünkhöz kapcsolt mellékletekre (Bukosza és mtsai., 2020). Kézi analízissel a Matrisome forrás adatbázisban (Naba és mtsai., 2012) már ismert és további, az ECM-al összefüggésben, eddigiekben elsődlegesen nem tárgyalt (pl. komplement rendszer elemek, lásd alább), 111 ECM-asszociált fehérjét azonosítottunk (részletekért szintén lsd.(Bukosza és mtsai., 2020). Észlelésünk egy korábbi, egészséges vesében végzett tanulmány eredményeinek nagyságrendileg megfelel, amelyben két különböző egér törzset vizsgálva 115 ECM-asszociált fehérjét azonosítottak (Randles és mtsai., 2015). A mennyiségi változásokat tekintve miR-193a FSGS egerek glomeruláris ECM fehérje preparátumában számos fehérje esetében erősen szignifikáns változást

észleltünk az egészséges kontrollal szemben, 18 fehérje mennyisége megnövekedett, 2 fehérje előfordulása csökkent, valamint négy olyan fehérjét észleltünk, amelyet kizárólag FSGS-ben szenvedő állatok glomeruláris ECM-ban lehetett megtalálni (**2. táblázat**).

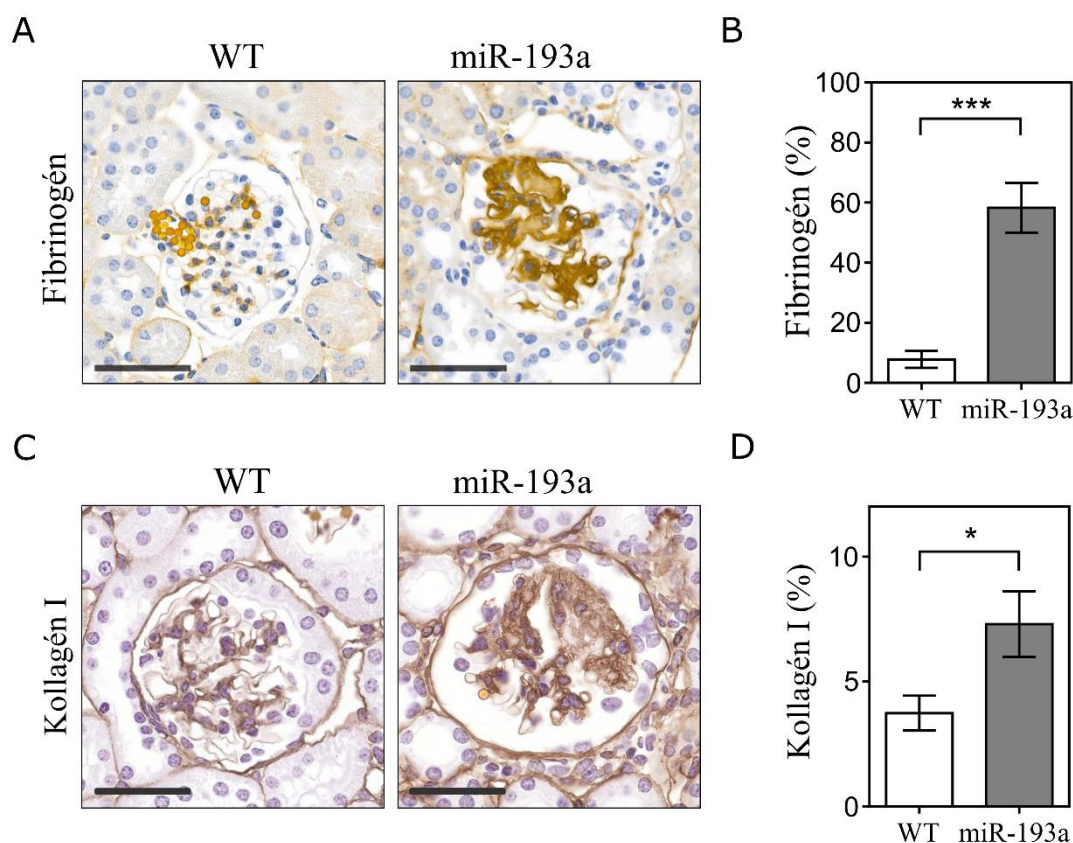


**9. ábra.** A vese szövettana és albuminuria miR-193a-túexpresszióval okozott fokális szegmentális glomeruloszklerózis (FSGS)-ban. Formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) minták fénymikroszkópos (FM) szövettani metszetein (a) Perjódsvav-Schiff (PAS) és (b) trikróm savas fukszin narancs G (SFOG) festéssel készült reprezentatív metszetek intrakapilláris kaszt képződést és extracelluláris fehérje lerakódást mutatnak 8 hetes miR-193a-indukált egér FSGS mintákon a vad típusú kontrollhoz (WT) képest. (c) Elektronmikroszkópos (EM) felvételeken podocita álláb vesztés, fúzió és leválás látható 8 hetes indukciót követően miR-193a FSGS egerekben, szemben az ép viszonyokat mutató vad típusú kontrollal (WT). (d) Vizelet albumin/kreatinin arány (Urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR)) vad-típusú kontroll és 8 hetes indukciót követően miR-193a FSGS egerekben g/g-ban kifejezve. Az FM képeken, lépték = 100  $\mu$ m; az EM felvételeken lépték = 2  $\mu$ m; a grafikonon megadott értékek átlagok  $\pm$  SEM,  $n \geq 5$ /csoport; kétmintás t-próba \*\*\*:  $p < 0.0001$ .

**2. táblázat.** Szignifikánsan megváltozott előfordulású fehérjék miR-193a-túlexpresszázó glomerulusban.

ID	Rövidítés	Gén név	FC
P11680	CFP	Properdin	*
F8WJ05	ITIH1	Inter-alpha-tripszin inhibitor 1	*
O70570	PIGR	Polimer Immunglobulin Receptor	*
P50404	SFTPD	Pulmonáris surfactan-asszociált protein D	*
Q56616	C1R	Komplement C1r	27,8
A8DUV3	HBA1	Hemoglobin alfa1 alegység	18,9
Q3UER8	FGG	Fibrinogén gamma lánc	15,4
Q3TGR2	FGB	Fibrinogén béta lánc	10,0
Q91X17	UMOD	Uromodulin	8,8
Q54AH9	HBB-B2	Hemoglobin béta-2 alegység	8,7
Q542I3	CRP	C-reaktív protein	7,6
A8DUK0	HBB-B1	Hemoglobin béta-1 alegység	7,4
P01029	C4B	Komplement C4-B	6,2
P07759	SERPINA3	Szerin proteináz inhibitor A3K	6,1
A0A2P9DUN 6	SERPINA1	Alpha-1-antitripszin 1	5,6
Q00623	APOA1	Apolipoprotein A-I	5,3
P11087	COL1A1	Kollagén I alfa-1 lánc	4,9
Q8VBX5	PPT1	Palmitoil-fehérje tioészteráz 1	4,8
Q9JMG7-2	HDGFL3	Hepatoma-eredetű növekedési faktorhoz kapcsolt fehérje 3	-5,2
O55186	CD59A	CD59A glikoprotein	-5,7

A génextpresszió változásokat a miR-193a-túlexpresszázó FSGS-ben szenvedő és a vad típusú (kontroll) egér glomerulusok közötti arány elemzésével vizsgáltuk; \* kontroll mintákban nem azonosítható; ID, nemzetközi fehérje azonosítási szám; FC (fold change) értsd. hányszoros változás miR-193a versus vad típus (kontroll) (pozitív=emelkedett, negatív=csökkent a kontrollhoz képest).

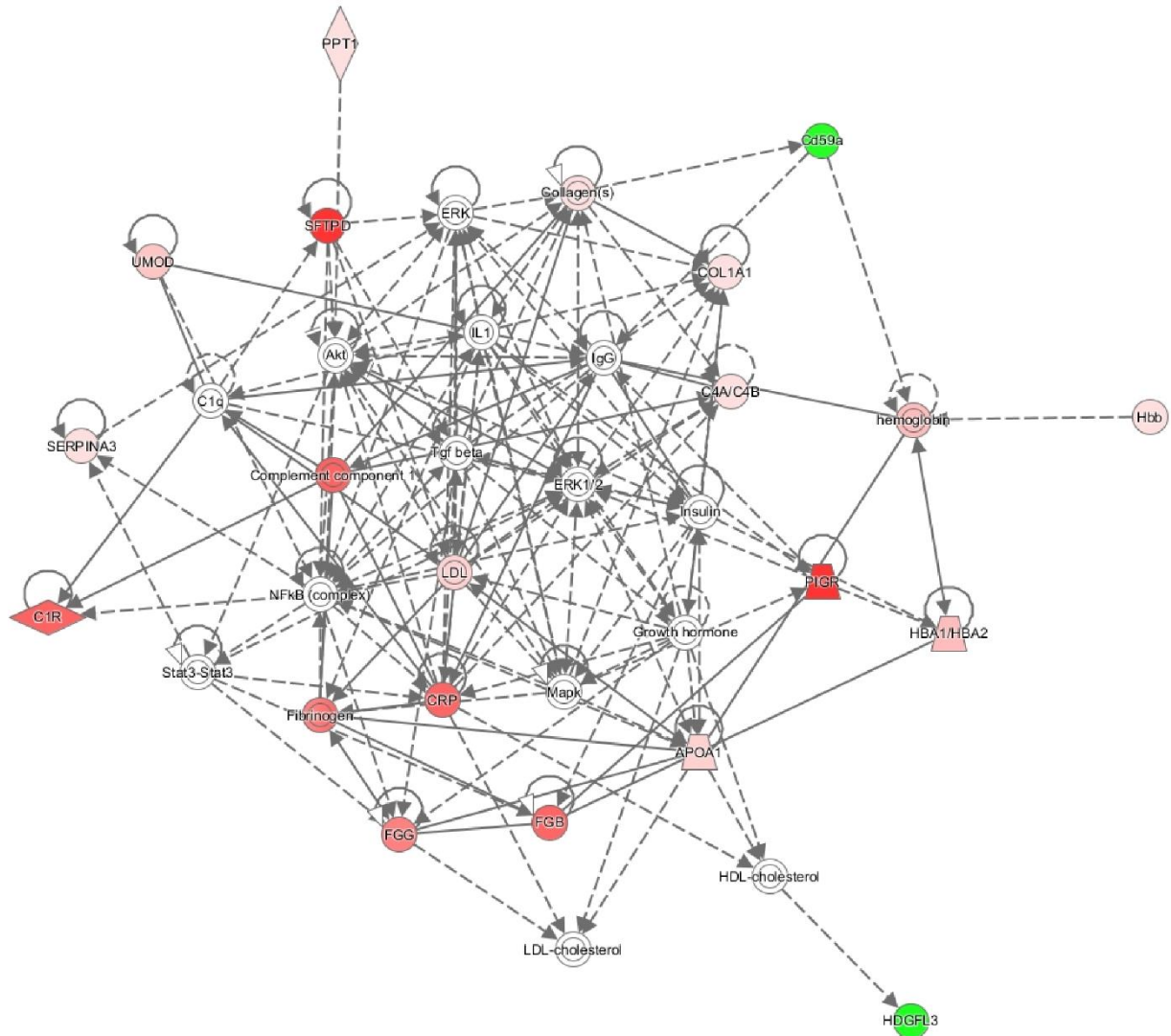


**10. ábra.** Fibrinogén és kollagén I fehérjék a vese glomeruláris mátrixban. (a) Fibrinogén festéssel kezelt FM-FFPE metszetek reprezentatív felvételei. (b) Fibrinogén-pozitív terület a teljes glomerulus felszín területének %-ában kifejezve vad-típusú kontroll (WT) és FSGS egerekben 8 héttel miR-193a indukciót követően. (c) Kollagén I immunhisztokémia reprezentatív felvételei. (d) Kollagén I-pozitív terület a teljes glomerulus felszín területének %-ában kifejezve vad-típusú kontroll (WT) és FSGS egerekben 8 héttel miR-193a indukciót követően. Lépték = 50  $\mu$ m; a grafikonon megadott értékek átlagok  $\pm$  SEM,  $n \geq 4$  minta/csoport, ahol minden adatpont min.10 kiértékelt glomerulus/minta átlagát mutatja; kétmintás t-próba \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

A miR-193a FSGS ECM mintákban a legszembetűnőbb változás az akut fázis válasz aktivációja volt. A C1R és C4B komplement komponensek, valamint komplement aktivátor C-reactive protein (CRP) mennyisége jelentősen megnövekedett, illetve properdin (CFP) jelent meg, miközben a membránkárosító komplex (membrane attack complex) gátló CD59A expressziója erősen lecsökkent (Izd. **2. táblázat**). A fibrinogén  $\alpha$ -,  $\beta$ -és  $\gamma$ -láncok (FGA, FGB, FGG) expressziója egységesen és jelentősen emelkedett FSGS-ben, bár az FGA nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét (**2. táblázat; 10. ábra A-B**). Az  $\alpha$ -globin (HBB-A1),  $\beta$ 1-globin (HBB-B1), and  $\beta$ 2-globin (HBB-B2) mennyisége markánsan megnőtt. Emellett az FSGS mintákban a polimer immunoglobulin receptor (PIGR) és a pulmonáris surfactan-asszociált protein D (SFTPD) jelentek meg,

amelyek a kontrolltól eltérően kizárólag a FSGS glomeruláris mátrixban voltak azonosíthatók. Vizsgálatunkban számos plazma proteáz inhibitor (SERPINA1, SERPINA3) szintje is jelentősen emelkedett vagy megjelenését FSGS-re jellemző módon újdonságként észleltük (ITIH1)(**2. táblázat**). A proteáz inhibitorok az ECM-et alkotó molekulák degradációját és megújulását befolyásolják, így hozzájárulnak a szklerózis kialakulásához. Ennek megfelelően a szklerózis marker Colla1 mennyisége jelentősen megnőtt a miR-193a-indukált FSGS-ben (**2. táblázat; 10. ábra C-D**). Az uromodulin (UMOD; Tamm–Horsfall protein) a vesében az immunrendszer szabályozásáért és citokin termelésért felelős központi jelentőségű fehérje (T. H. Wu és mtsai., 2018) mennyisége szintén jelentősen emelkedett (**2. táblázat**). Az Apolipoprotein A1 (APOA1)-t (**2. táblázat**), a vérplazma fő magas-denzitású lipoprotein (HDL) apoprotein alkotóelemének mennyiségét lényegesen magasabbnak találtuk. A legnagyobb mértékben csökkent kifejeződésű fehérje a hepatoma-eredetű növekedési faktor kapcsolt fehérje 3 (HDGFL3, HRP3) volt, amelyről ismert, hogy szekretált formája mitogén hatással bír főként endotél sejtekre nézve (**2. táblázat**). Több, a GBM és a szoros értelemben vett, strukturális ECM alkotóelemekhez tartozó fehérje (pl.COL12A1, COL3A1 és TINAG) mennyisége is megnőtt, azonban a szignifikancia szintjét nem érte el. Eredményeinket az „Ingenuity pathway” analízissel (IPA) elemezve a fentiekhez hasonló következtetésre jutottunk, az IPA megerősítette az akut fázis reakció aktivációját, mint a miR-193a-FSGS glomerulus ECM mintákban észlelt legkiemelkedőbb rendszer szintű változást (**11. ábra**)





**11. ábra.** Az FSGS-ben legnagyobb mértékben megváltozott expressziójú glomeruláris ECM fehérjék hálózata. A **2. táblázatban** felsorolt diszregulált géneket és interakciójukat az Ingenuity Pathway analízissel értékeltük (piros: alulszabályozott; zöld: túlszabályozott; a jelölés színerőssége a változás nagyságával arányos).

Vizsgálatunk előnye mellett annak nehézségét is jelentette, hogy a tömegspektrometria analízis a módszerre jellemző, érthető módon a fehérjéket azok eredetére való tekintet nélkül azonosítja az ECM mintákban, eszerint számos, a májban szintetizált fehérje előfordulását észleltünk. Ugyanakkor előnytelennek mondható, hogy a tömegspektrometria kis mennyiségű, gyenge ECM kapcsolódással bíró vagy általánosságban, más okból MS-vizsgálatra alkalmatlan fehérjéket nem képes detektálni.

### 4.2.3. További FSGS-ben potenciálisan releváns ECM-gének egér-humán RNS-szintű összehasonlítás alapján

A fenti ok miatt egy másik megközelítésben további, az FSGS patomechanizmusában potenciálisan fontos ECM gének megtalálását tűztük ki célul, hogy kimutassunk eddig nem észlelt fehérjéket. Korábban a munkacsoportunk által publikált miR-193a-túlexpresszált, 5 hetes FSGS-indukciót követően vizsgált egér glomerulus (Gebeshuber és mtsai., 2013) és a Steve Potter csoport által lézer-disszekcióval nyert humán glomerulus minták RNS-profiljának (Bennett és mtsai., 2007) összehasonlításával a több, mint háromszoros mértékben (növekedett vagy csökkent), mindkét (egér és ember) esetben változott kifejeződésű géneket kerestünk.

A közös pontok ECM kapcsolatát a Matrisome forrás adatbázissal (Naba és mtsai., 2012) és PubMed kereséssel erősítettük meg. Ez a vizsgálat mRNS szinten 32 túl- és 5 alulszabályozott, ECM-kapcsolt, az FSGS patomechanizmusában potenciálisan jelentős génre irányította rá a figyelmet (**3. táblázat**). A fehérje szintű tömegspektrometria vizsgálat eredményeivel összhangban számos komplement kaskád elem, az UMOD és a SERPINA1 expressziója jelentősen felerősödött mRNS szinten, humán és egér FSGS-ben egyaránt (**3. táblázat**). Az mRNS szinten legjobban emelkedett géneknek az inzulin growth factor binding protein 1 (IGFBP1), az angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), a tubulointersticiális nefritisz antigén (TINAG), és az osteopontin (OPN, SPP1) bizonyultak. A legerősebben alulszabályozott gén a sclerostin (SOST), a bone morphogenic protein (BMP) jelátviteli út gátló fehérjéje volt (**3. táblázat**). A podocita túlélésért felelősnek tudható vaszkuláris endoteliális növekedési faktor-alfa (VEGFA) szintén nem volt kimutatható (**3. táblázat**). A megváltozott szabályozású gének közül számos fehérje szerepel az immunválasz szabályozásában, kötődik a koagulációs kaskádhoz vagy áll összefüggésben különféle sejt jelátviteli útvonalakkal (Wnt, TGF- $\beta$ , IGF, VEGF) (**3. táblázat**).

**3. táblázat.** Megváltozott expressziójú ECM gének miR-193a-indukált FSGS eger és human FSGS glomerulus mintákban.

Gén név	Rövidítés	FC egerben <sup>1</sup>	FC emberben <sup>2</sup>	Funkció
Inzulin-szerű növekedési factor kötő fehérje 1	IGFBP1	100,6	9,1	IGF jelátvitel stimulátor
Angiotenzin I konvertáz enzim 2	ACE2	95,7	5,9	vazokonstriktor, magasvérnyomás
Tubulointerstitiális Nefritisz Antigen	TINAG	65,4	4,3	glikoprotein
Defenzin béta 1	DEFB1	52,0	11,6	mikrobicid, citotoxikus
Uromodulin	UMOD	44,2	51,3	kalcium krisztallizáció gátló, immunválasz szabályozó
Foszfolipáz A1 tag A	PLA1A	42,2	5,0	foszfolipáz, jelátvitel
Komplement faktor I	CFI	37,9	6,9	komplement kaskád szabályozó
Szerpin A család 1f tagja	SERPINA1	28,3	6,3	koagulációs kaskád
Oszteopontin	SPP1	26,2	122,8	sejt jelátvitel modulátor (gyulladás, TGF- $\beta$ , Wnt)
Kininogén 1	KNG1	26,1	26,3	koagulációs kaskád
EPH Receptor B2	EPHB2	20,8	3,2	efrin jelátvitel
Lumikán	LUM	17,6	45,5	proteoglikán
Szekretált Frizzled kapcsoló fehérje 1	SFRP1	17,3	16,6	Wnt jelátvitel modulátor
Reelin	RELN	16,1	6,1	sejt pozicionálás/migráció
WAP 4-Diszulfid Központi Domain 2	WFDC2	15,2	3,5	proteáz gátló
Komplement Faktor B	CFB	12,8	7,0	komplement kaskád szabályozó
Szekretogranin V	SCG5	9,5	9,3	chaperone

Fibulin 1	FBLN1	8,4	3,1	glikoprotein
Mucin 1	MUC1	8,0	3,8	jelátvitel
Komplement C7	C7	7,5	5,3	komplement kaszád szabályozó
Szemaforin 4D	SEMA4D	6,9	5,0	glikoprotein, sejt jelátvitel
C-X-C Motivum Kemokin Ligand 14	CXCL14	6,9	29,2	citokin, immunválasz szabályozó
Szöveti factor útvonal gátló 2	TFPI2	6,9	3,5	koagulációs kaszád
Laminin Gamma 2 alegység	LAMC2	6,4	3,3	strukturális glikoprotein
Sztanniokalcin 1	STC1	6,0	4,4	kalcium/foszfat egyensúly szabályozó
Glipikán 4	GPC4	5,0	4,4	glikoprotein
Klaszterin	CLU	4,9	9,0	chaperone
Szerin Proteáz 23	PRSS23	4,8	25,7	szerin proteáz
Inzulin-szerű növekedési factor kötő fehérje 3	IGFBP3	4,4	10,5	IGF jelátvitel stimulátor
Kollagén Tripla helix ismétlődőelem tartalmú 1	CTHRC1	3,9	19,6	vaszkuláris remodeling, Wnt jelátvitel
Asporin	ASPN	3,9	5,4	kalcium-kötő, TGF- $\beta$ gátló
N- acetilgalactozaminiltransz feráz 12	GALNT12	3,9	16,3	fehérje glikoziláció
Sushi, Nidogén és EGF- szerű domainek 1	SNED1	0,27	0,33	inzulin-válasz
Foszfolipáz A2 Receptor 1	PLA2R1	0,25	0,17	foszfolipáz jelátvitel
Vaszkuláris Endoteliális növekedési factor A	VEGFA	0,16	0,19	proliferáció, migráció, túlélés
Kollagén IV típus alfa 3 lánc	COL4A3	0,15	0,20	strukturális glikoprotein
Szklerosztin	SOST	0,02	0,14	sejt jelátvitel modulátor (Wnt, TGF- $\beta$ )

FC, lineáris többszörös változás (fold-change) FSGS/control; <sup>1</sup> miR-193 modell, a Gebeshuber munkacsoport közleménye (Gebeshuber és mtsai., 2013); <sup>2</sup> idiopathiás FSGS páciensek, a Bennett munkacsoport (Bennett és mtsai., 2007).

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Obezitás, prediabétesz okozta korai nefropátia patkányban

Az *obez, prediabéteszes Long Evans patkány vizsgálatban* célunk a vese érintettség vizsgálata volt, illetve ebben a magas kardiometabolikus rizikóval jellemezhető állapotban a különböző szervi megbetegedések vesekárosodással való összefüggéseit – kollaborációban – rendszer szemléletű megközelítésben kívántuk tanulmányozni.

Vizsgálatunkban 20 hetes zsírdús táp etetés és egyszeri kisdózisú (20 mg/ttkg) STZ-injekció hatására elhízás, megnövekedett testzsír tartalom és megváltozott zsíreloszlás valamint kezdődő szénhidrát anyagcserezavar (tartósan, de kismértékben emelkedett vércukorszint, glükózintolerancia és inzulinrezisztencia) alakult ki.

Megjegyzendő, hogy az irodalomban többféle, az inzulin-termelő hasnyálmirigy bétasejtek számára toxikus streptozotocint alkalmazó rágcsáló modell ismeretes. A klasszikus, nagy dózisú (60 mg/ttkg) kezelési séma, (közel) totális  $\beta$ -sejt depléció révén az inzulin-hiányos 1-es típusú diabétesz modellje. Azonban a kis dózisú (15-30 mg/ttkg), többszöri (Barrière és mtsai., 2018; Nath és mtsai., 2017) vagy egyszeri STZ injekciót (Bhandari és mtsai., 2015; Ionut és mtsai., 2010) zsíretetéssel kombináló eljárások jól modellezik a 2-es típusú humán diabétesz metabolikus változásait (Chao és mtsai., 2018). Vizsgálatunkban is az utóbbihoz hasonló kísérleti felállást alkalmaztunk.

A modellt biztosító társ munkacsoport *in vivo* és *ex vivo* kardiovaszkuláris vizsgálatokkal bal kamrai diasztolés diszfunkciót és hipertrófiát, valamint a szívizomsejtekben intracelluláris lipid felhalmozódást, subsarcolemmális mitochondriumokhoz köthető megnövekedett oxidatív stresszt, mitofágia korai változásait és zsírmáj kialakulását írta le az általunk is vizsgált patkányokban (Koncsos és mtsai., 2016).

Vizsgálatunkban az obezitással és prediabéteszes állapottal jellemezhető PRED patkányok veséjét tanulmányozva a glomeruláris alapmembránban a IV-es típusú kollagén fehérje megnövekedett arányát és enyhén megváltozott tubulus működést észleltünk, a vese más nyilvánvaló funkcionális vagy morfológiai károsodására utaló jelek nélkül. A zsírszöveti átépülést (remodellinget) extrém módon emelkedett plazma leptin szint, valamint a vizscerális (epididimális) és a szubkután (lágyéki, fehér) zsírszövetekben egyaránt megnövekedett TGF- $\beta$ 1 mRNS expresszió igazolta,

ugyanakkor a lágyéki lokalizációhoz képest az epidermális zsírszövetben emelkedett PPAR $\gamma$  és Adpn mRNS expresszió a kontroll és PRED csoportban lényegesen nem különbözött. A fent említett más szervi károsodások (máj, szív, zsírszövet) fényében a vesére nézve enyhe fenotípus meglepő eredmény volt. A saját és a korábban már közölt eredmények (Koncsos és mtsai., 2016) alapján elmondhatjuk, hogy Long Evans patkányban a prediabéteszes elhízással okozott szervkárosodás morfológiai jelei korábban jelentkeznek a zsírszövetben, a szívben és a májban, mint a vesében.

Az elhízás a vesékre háruló megnövekedett filtrációs igény okozta glomeruláris hiperfiltráció illetve a nagyobb filtrációs felület fedettségének biztosítási igénye miatti mechanikus stressz útján vezethet podocita károsodáshoz. Az irodalom az elhízással összefüggő glomerulopátiát (ORG) ismer, amely szövettani vizsgálattal glomerulomegáliával és renális intracelluláris lipid lerakódással járó lassú progressziójú FSGS képében jelenik meg (Szeto és mtsai., 2016a; Y. Wu és mtsai., 2006). Ugyanakkor ismert, hogy a hiperglikémia a glomeruláris mátrix átépülését okozza. Az obez, prediabéteszes állatok veséinek vizsgálatok ezirányban vártunk eltéréseket.

Nem várt módon a PRED patkányok glomerulusainak szövettani morfológiáját nagyrészt normálisnak találtuk. A betegség e szakaszában az obezitással összefüggő glomerulopátiára (ORG) jellemző **glomerulomegália** még nem volt kimutatható, a glomerulusok átlagos mérete nem növekedett PRED állatokban a KON-hoz képest. A glomeruláris érgomolyag relatív PAS-pozitív területeinek aránya összességében nem utalt ECM felhalmozódásra. Ugyanakkor a PRED patkányok glomeruláris GBM-jában jelentősen megnövekedett IV-es típusú kollagén fehérje lerakódást észleltünk, ami az ECM átépülésére, a mennyiségit megelőző minőségi összetétel változásra utalt. A kollagének, különösen az I, IV $\alpha$ 3 és IV $\alpha$ 4 típusok felhalmozódása GBM-ben tipikus jelenség mind a nem diabéteszes, magas zsírtartalmú táppal etetett egér ORG (Declèves és mtsai., 2014; Szeto és mtsai., 2016b), mind a DN modelljeiben (Tang és mtsai., 2017; Zeisberg és mtsai., 2002). A korai obez, prediabéteszes patkány modellünkben megfigyelt kollagén IV, illetve az előrehaladott egér FSGS ECM-ban az alábbiakban részletezett kollagén I felhalmozódás az irodalmi ismeretekkel egybecsengenek.

Mivel *in vitro* vizsgálatok alapján a magas glükóz szint ismerten fokozza a mezangialis sejtek kollagén IV szintézisét (Taniguchi és mtsai., 2013), a vizsgálatunkban megnövekedett glomeruláris IV-es típusú kollagén fehérje lerakódás hátterében a tartósan

emelkedett plazma glükóz szint szerepe is felmerült. Az  $\alpha$ SMA immunfestés azonban következményes mezangiális sejt aktivációt nem igazolt.

Szintén az emelkedett vércukorszint szerepét vizsgálva számos közlemény (diabéteszesek humán mintáin, sejt kultúrán végzett és patkány kísérlet) tárgyalja az ECM fehérjék homeosztázisát biztosító mátrix metalloproteázok (MMP-k, főként: MMP-2, MMP-9 és MT1-MMP) és gátló fehérjék a TIMP-ek (TIMP-1, -2) megváltozott egyensúlyát, amely az ECM fehérjék csökkent degradációjához vezethet elhízásban és diabéteszben (Ohtomo és mtsai., 2008; Seung és mtsai., 2005; Wong és mtsai., 2011; J. Yang és mtsai., 2009). Mindez, bár bizonyítékokkal szolgálni nem tudunk, modellünkben is inkább a lassult kollagén turnover-re irányította a figyelmet a vese ECM-ban. Amennyiben az egér és humán összehasonlításban (lsd. alább) egyaránt észlelhető szignifikánsan csökkent COL4a3 génexpressziót szabályozási visszacsatolásként értelmezzük, az szintén ez irányú feltételezésünket támogatja.

A leptin egy elsősorban a zsírszövetben szintetizált hormon, amelynek plazma koncentrációja korrelál a testzsír mennyiségével, ezért az elhízás hiperleptinémiával jár (Maffei és mtsai., 1995), amint azt a kutatásunkban is megfigyeltük. A vese nagy mennyiségben expresszálja a leptin rövid receptorát, az Ob-Ra-t (Maffei és mtsai., 1995; Wolf és mtsai., 2002; Wolf & Ziyadeh, 2006). Ismert, hogy a leptin a TGF- $\beta$  aktivációjában kofaktorként szerepelhet, így fontos szereppel bírhat a tubulointersticiális fibrózis kialakulásában (Kümpers és mtsai., 2007). Patkányokban pedig kimutatták, hogy a leptin infúzió fokozza a glomeruláris TGF- $\beta$ 1 és kollagén IV expresszióját (Wolf és mtsai., 1999). Tehát a leptin fontos szerepet játszhat az elhízással okozott vesekárosodásban (W. Cui és mtsai., 2013).

Vizsgálatunkban a plazma leptin koncentráció növekedése kiemelkedő volt és tartósan fennállt, ezért feltételeztük, hogy a leptin/Ob-Ra/TGF- $\beta$ 1 útvonal szerepet játszhat a PRED csoportban a glomeruláris extracelluláris mátrixban észlelt kollagén IV akkumulációban. Az Ob-Ra és a TGF- $\beta$ 1 mRNS kifejeződését azonban PRED állapot nem befolyásolta, tehát a krónikusan magas plazma leptin szint önmagában nem volt elegendő az ORG vagy a renális tubulointersticiális fibrózis indukciójához a Long-Evans patkányban.

Az is váratlan eredmény, hogy kezelésünk a TGF- $\beta$ 1 mRNS kifejeződését nem befolyásolta, mert egy 10 hetes zsíros diétával indukált elhízott, magasvérnyomásos kutya

kísérletből már ismert, hogy a sovány csoporthoz képest relatív korai elváltozásként a medullában TGF- $\beta$ 1 mRNS expresszió növekedést észleltek (sőt, MMP3 mRNS-szint csökkenésével párhuzamosan, amely az ECM felhalmozódáshoz ott kézenfekvő magyarázatul szolgált) (Gu és mtsai., 2004).

Említést érdemel, hogy vesekéreg és a vesevelő TGF- $\beta$ 1 kifejeződésében medulláris túlsúlyt észleltünk mind kontroll mind PRED patkányokban. A csoportok közti különbség hiánya egyértelművé teszi, hogy a cortexhez képest magasabb medulláris TGF- $\beta$ 1-expresszió nem tekintendő patológiás jellemzőnek. Valójában a vese génexpressziójának regionális különbségeit vizsgáló részletes tanulmányban közölt Tgfb1 medulla/cortex=2,0 aránynak (Tamura és mtsai., 2006) eredményünk nagyságrendileg megfelel. Hozzá kell tenni azonban, hogy a kéreg-velő szétválasztás kevésbé pontosan reprodukálható, illetve standardizálható, emiatt a génexpressziós különbségekben csak nagyságrendi összehasonlítások tehetők. Tekintettel a TGF- $\beta$  különböző izoformáinak jellemző előfordulására, rno-TGF- $\beta$ 1 specifikus primereket alkalmaztunk, így eredményeink a proximális tubulussejtek cortex-medulla lokalizációban való előfordulását tükrözhetik. Másfelől kimutatták, hogy a kéregtől a velő irányában növekvő vizelet ozmolaritás növekedés TGF- $\beta$  és Egr-1 expresszióját befolyásolja, így vezethet patológiás körülmények között a medullában hosszan tartó hiperozmolaritás fokozott TGF- $\beta$  és Egr-1 expresszió révén extracelluláris mátrix elemek (Col3a1, Col4a1) felhalmozódásához (Mózes és mtsai., 2017).

A **glomeruláris hiperfiltráció**, az elhízásban megnövekedett testméretek miatt fokozott filtrációs igény nyomán az afferens arteriolák értágulatának következtében jön létre (Barry M. Brenner és mtsai., 1996; P. Ruggenti és mtsai., 2012). Modellünkben a plazma kreatinin és karbamid koncentrációk a normál tartományba estek, a glomeruláris funkció megtartott volt, a podocita stresszt jelző dezmin (Matsusaka és mtsai., 2011) fehérje expressziójában sem észleltünk különbséget a két csoport között, mindezek nem utaltak glomeruláris hiperfiltrációra. Ellentmondásosnak tűnhet, hogy a vese kiválasztó működésének monitorozására általánosan használt plazma karbamid koncentrációt a PRED patkányokban alacsonyabbnak találtuk a KON állatokhoz képest. Azonban ismert, hogy az ú.n. kafetéria-diétán (magas zsír- és szénhidrát-tartalmú étrend) tartott rágcsálókban a máj karbamid szintézise csökkent az arginin korlátozott elérhetősége miatt (Barber és mtsai., 1985; Sabater és mtsai., 2014). Ennek megfelelően a PRED patkányok



alacsonyabb plazma karbamid koncentrációjának hátterében a máj csökkent karbamid szintézise állhat, és ez nem a PRED-ben megnövekedett glomeruláris filtrációnak tulajdonítható.

Az **intracelluláris lipid zárványok** jelenléte az elhízottak veséiben tapasztalható jellemző szövettani eltérés mind rágcsáló modellekben, mind a humán gyakorlatban, ami arra utal, hogy a rendellenes lipid metabolizmus és lipotoxicitás a vesefunkció károsodásban jelentős szereppel bírhat (De Vries & Rabelink, 2013; Herman-Edelstein és mtsai., 2014; Martínez-García és mtsai., 2015). A szív és a máj mintákban észleltektől eltérően (Koncsos és mtsai., 2016) a PRED patkányok veséjében intracelluláris lipid akkumuláció nem volt kimutatható sem indirekt módszerrel, mert a PAS festett FFPE metszeten nem láttunk mikrovakuolákat, sem direkt módszerekkel, mivel az olajvörös O-val festett fagyasztott metszeten nem tudtunk kimutatni vörösen festődő lipid cseppeket.

Noha a globális vesefunkcióban eltérést nem találtunk, az egyaránt megnövekedett vesekérgi és medulláris Lcn2 mRNA expresszió a **tubuláris működés változására** utalt a PRED patkányokban, bár ez a vizelet Lcn2 fehérje ürítésben nem volt tetten érhető. A Lcn2 (az NGAL fehérjét kódoló gén) korai, fokozott termelődése gyulladáskeltő (Kaucsár és mtsai., 2016; Shang, W;Wang, 2017), apoptózist serkentő és sejtosztódást csökkentő (Pawar és mtsai., 2012; Viau és mtsai., 2010) hatások révén felgyorsíthatja a CKD-t.

Feltételezésünk szerint a megváltozott tubuláris működés részeként növekvő Lcn2 mRNA expresszió az ORG-ben a nagyon korai események egyike és így a későbbi progresszív vesekárosodásának egyik kiváltó tényezője lehet. Meg kell azonban jegyezni, hogy a PRED patkányokban ugyan markánsan emelkedett a Lcn2 mRNA expresszió a KON-hoz képest, ennek mértéke azonban jelentősen elmaradt a súlyos iszkémiás, toxikus vagy gyulladással károsodások után tapasztaltaktól. Ugyanakkor az Lcn2/NGAL-al összefüggésbe hozható potenciális mechanizmusok közül a gyulladással út vonal szerepe a legkevésbé valószínű, mivel a modellünk vizsgált stádiumában PRED állatokban teljes szervezetre nézve inkább csökkent gyulladással hajlamot figyeltünk meg. Az apoptózisra illetve sejtproliferációra kifejtett hatások irányában további vizsgálat lenne szükséges. Például miokardiális iszkémiában megfigyelték, hogy az Lcn2 (NGAL) elnyomja az iszkémiás károsodásra adott, LC3 és p62 markerek csökkenésével jelzett, előnyösnek tartott autofágia-választ, ami hozzájárul a fokozott apoptózishoz és ennek nyomán a kardiális diszfunkcióhoz (Sung és mtsai., 2017). Egér ischaemia/reperfúziós károsodás

(IRI) modellekben szerzett tapasztalatok alapján – esetleg egy hosszabb zsíretetés során – PCNA (proliferating cell nuclear antigen) mRNS és fehérje expressziót, valamint LC3, Beclin-1, Bcl-2, Bax apoptózis marker-fehérjék expresszióját volna érdemes vizsgálni ((Y. li Zhang és mtsai., 2018)).

A gyulladós citokinek között az IL-1 $\beta$ , mint a gyulladás egyik fő mediátora központi jelentőséggel bír különféle szövetekben (Dinarello, 2009). Meglepő módon modellünkben a PRED vesékben mind a vesekéreg, mind a vesevelő IL-1 $\beta$  mRNS expressziója csökkent a KON patkányokéhoz képest. Korábban kimutatták, hogy a vese és zsírszövetben megnövekedett TNF $\alpha$  termelés a beáramló, és a gyulladást közvetítő makrofágokból származik, ami hozzájárul az elhízással kapcsolatos vesekárosodáshoz (Börgeson és mtsai., 2015; Ichinose és mtsai., 2006; Ma és mtsai., 2016). Vizsgálatunkban a TNF $\alpha$  mRNS expressziója azonban PRED és KON vesékben hasonló volt a kéregben és a medullában egyaránt. Ezek az eredmények együttesen azt sugallják, hogy modellünkben a PRED vesékben nem alakult ki gyulladás.

Továbbá, a PRED patkányokban a KON-hoz képest a kis mértékben, de szignifikánsan alacsonyabb plazma CRP koncentráció (Koncsos és mtsai., 2016) a várttól eltérő eredmény az elhízott modellekben és csökkent szisztémás gyulladás hajlamra utal, de egybecseng a vesében tett megfigyeléseinkkel.

Ezzel szemben közismert, hogy metabolikus szindróma (elhízás, szénhidrátanyagcsere zavar, magasvérnyomás, diszlipidémia) modellekben a viszcerális zsírszövet átalakul, mely hormonok és citokinek termelése révén alacsony szintű szisztémás gyulladást tart fenn, mely a célszerv károsodás közvetítője lehet (Hotamisligil, 2006). Jelenlegi tudásunk szerint publikációnk az első olyan közlemény, amelyik tartós zsíretetéses állatmodelben minimális szervi/szisztémás károsodásról és a gyulladás hiányáról számol be. A szakirodalomban azonban vannak adatok arról, hogy néhány, 30-at megközelítő vagy meghaladó BMI-vel élő személynek lehet alacsony a CRP szintje (Habib és mtsai., 2018; Keşkek és mtsai., 2018; Sepandar és mtsai., 2019), tehát az elhízás nem feltétlenül okoz gyulladást minden egyes egyénnél. Azt feltételezzük, hogy az elhízás során kialakuló zsírszövet felhalmozódásra adott eltérő szervezeti reakció és/vagy bizonyos gyulladós mediátorok eltérő működése lehetnek a felelősek a jelenségért.

Itt meg kell jegyeznünk azt is, hogy a szakirodalomban részletesen tárgyalt adiponektin, az inzulin-érzékenyítő, gyulladáellenes, vazoprotektív tulajdonságokkal

bíró (Kubota és mtsai., 2002; McClain és mtsai., 2005; Yamauchi és mtsai., 2001), egyik legismertebb zsírszöveti hormon (adipokin). Az adiponektin és a vesekárosodás közti kapcsolat részleteiben még nem tisztázott, és napjainkban számos vizsgálat tárgyát képezi. Adiponektin és receptorai (AdipoR1, -R2) expressziójának AMPK-közvetített módon renoprotektív szerepet tulajdonítanak. Adiponektin-génkiütött rágcsáló modellben megnövekedett albuminuriát és podociták szegmentális állábfúzióját figyelték meg, amit adiponektin pótlás képes volt visszafordítani (Sharma és mtsai., 2008), de az adiponektin kezelés AMPK-függő módon csökkentette a podocita apoptózist és az angiotenzin II-vel okozott vese tubulus sejt károsodást is (Fang és mtsai., 2013; Rutkowski és mtsai., 2013). Epidemiológiai megfigyelések szerint az adiponektin expressziója csökken elhízásban és diabéteszben (Choi és mtsai., 2004), ugyanakkor inkább emelkedett szérumban adiponektin szintet találtak CKD/ESRD betegekben (Menon és mtsai., 2006). Modellünkben a kezelés hatására a zsírszöveti adiponektin expresszióban nem észleltünk lényeges eltérést, ezért további vizsgálatát sem tartottuk ígéretesnek, bár felvethető, hogy szérumban és vizeletben adiponektin fehérje (három ismert forma) koncentrációjának illetve receptorai expressziójának vizsgálatával a képet árnyalni lehetett volna.

Noha a szélsőséges elhízásban a plazma lipid (össz-, LDL- és HDL-koleszterin, TG) szintek emelkedése volt várható, a plazma lipidek és a máj enzimek (GOT, GPT) koncentrációi egyaránt a referencia tartományon belül maradtak a PRED patkányokban és nem különböztek a KON csoportban kapott értékektől. Ez a jelenség meglepő, de az irodalomban nem egyedülálló, mivel ismert, hogy a zsíretetés (HFD) nem minden patkány kísérletben növeli az összkoleszterin szintet (Gamede és mtsai., 2019). Ezen kívül, több közlemény ismertet olyan megfigyeléseket, amelyek szerint egyes elhízott betegek lipid profilja az egészséges tartományban maradt (Johari és mtsai., 2018; Mena-Sánchez és mtsai., 2018; Tateyama és mtsai., 2018). Így az elhízás valószínűleg diszlipidémiához vezet, de nem feltétlenül minden elhízott alanynál.

Megfigyeléseinkre alapozott feltételezésünk szerint a Long-Evans törzsnél megfigyelt elhízással okozott társbetegségekkel szembeni szokatlan ellenálló-képességet legalább részben a diszlipidémia, valamint a szisztémás és lokális gyulladás hiánya magyarázhatja. Ezért obesez, prediabetészes Long-Evans patkány modellünk egyedülálló lehetőséget kínál az „elhízás paradoxon” mechanizmusainak tanulmányozására

leképezve azokat a betegeket, akik az elhízás ellenére egészségesek, vagy legalábbis egyes szervi károsodásra nézve hosszasan ellenállóak maradnak.

A tanulmányunk néhány hiányossága szükségszerűen korlátozza az eredményeinkből levonható következtetések kizárólagosságát. Ilyen jellemző, többek között, hogy vizsgálatunkat kizárólag hím patkányokon végeztük. A betegségfolyamatok jelentősen különbözhetnek a két nemből (lásd az NIH NOT-OD-15-102; <https://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/not-od-15-102.html>), pl. a nőstény patkányok kevésbé hajlamosak a vesekárosodásra, mint a hímek. Mivel azonban hím PRED patkányokban csak enyhe korai vesekárosodás volt kimutatható, valószínűtlennek tűnik, hogy adott modell azonos stádiumában nőstény patkányokon más következtetést vonhattunk volna le.

Megjegyzendő, hogy a törzskülönbségek nem szokatlanok patkányokban, ahogyan azt korábban kimutattuk a doxorubicin nefropátiával kapcsolatban (Szalay és mtsai., 2015). Eredményeink és a szakirodalomban közölt eredmények összehasonlítása felveti a kérdést, hogy a Long-Evans patkányok hasonlóan érzékenyek-e az zsíros étrenddel okozott elhízásra és a prediabeteszre, mint más patkány vagy egér törzsek (Udi és mtsai., 2017). Az eddig ismert eredmények többsége azt mutatja, hogy más patkánytörzsekben ORG alakul ki 20 hét, sőt akár már 10 hetes zsíros étrend hatására. Legjobb tudomásunk szerint az elhízással kapcsolatos társbetegségek gyakoriságát és súlyosságát nem összehasonlították össze Long-Evans és más patkány törzsek között. Saját eredményeink fényében úgy tűnik, hogy a Long-Evans patkányok ellenállóbbak az ORG-vel szemben, mint a kísérletekben gyakran vizsgált többi patkány törzs. A Long-Evans vesék viszonylag fokozott ellenálló képessége az elhízással okozott károsodásokkal szemben azonban lehetővé tette számunkra, hogy megvizsgáljuk a PRED Long-Evans patkányok különböző szerveinek károsodásainak alakulását. A Long-Evans patkány törzs ajánlható az elhízással kapcsolatos társbetegségek elleni védekező mechanizmusok azonosítására, mert az ilyen információk terápiás hasznot ígérnek a jövőre nézve.

## 5.2. A glomeruláris ECM összetétele előrehaladott, miR-193a-indukált egér FSGS-ben

A második kísérletsorozatban primer FSGS transzgenikus állatmodelljén a veseglomerulus ECM-ának az egészségeshez képest megváltozott, patológiás összetételére fókuszáltunk. Célunk nem pusztán egy leíró tanulmány elkészítése, hanem a glomeruláris ECM-ban az FSGS progressziója során tettenérhető patológiás folyamatok azonosítása, majd ezek rendszer- és hálózat szemléletű értelmezése volt. Az így feltárt összefüggések célzott terápiás befolyásolásával – reményeink szerint – a jövőben javulás érhető majd el az FSGS kezelésében.

Az elmúlt években az egyre szélesebb körben elérhetővé vált multiplex vizsgáló módszerek (RNS-szekvenálás, tömegspektrometria) alkalmazása ugrásszerűen növelte transzkriptom és proteom-szintű ismereteinket a veseglomerulus vonatkozásában. Az egyes géneket/fehérjéket középpontba helyező megközelítés helyett napjainkban a patológiás folyamatok, a sejtjelátviteli útvonalak, a szabályozó rendszerek és ezek hálózatszerű kapcsolódásának vizsgálatát tartjuk korszerűnek. Erre nemcsak amiatt van szükség, mert a multiplex vizsgálatok több száz-as-ezres nagyságrendű molekuláris mintázatokat adó eredménye másképp aligha volna értelmezhető, hanem azért is, mert terápiás célpont szempontból nem ideális, hogy az egyes kulcs-szerepűnek feltételezett fehérjék funkcióját hasonló szerepű társaik könnyen átvehetik.

Az általunk is választott tömegspektrometriát (MS) már számos, a vese glomerulus fiziológiás és patológiás folyamatainak feltárását, illetve potenciális gyógyszer-célpontok azonosítását célzó vizsgálatban alkalmazták. Ép podociták MS vizsgálatával egy, az egészséges működést fenntartó >9000 különböző fehérjéből álló rendszert írtak le, amelyek közt mennyiségi szempontból a citoszkeleton fehérjék és az FSGS-sal, illetve örökletes nefrózis szindrómával összefüggő gének jelentős felülreprezentációját észlelték. Utóbbiak az ilyen irányú betegség-hajlamot magyarázhatják, illetve terápiás célpontokkal szolgálhatnak (Rinschen és mtsai., 2018). Egy igen szofisztikált megközelítés a GBM-on a podociták mechanikus stabilitását biztosító, specifikus, fokális adhesome (FA) alkotó fehérjéinek MS vizsgálata rámutatott a ECM érzékelés és az „outside-in” jelátvitel fontosságára, miközben feltárta EPB41L5 szerepét a RhoGEF, ARHGEF18 bevonása által közvetített actomiozin aktivációval jellemzett FA érésben (Schell és mtsai., 2017). Egy nemrégiben megjelent tanulmány

pedig stabil  $^{15}\text{N}$ -izotóp metabolikus jelöléssel kombinált MS-vizsgálattal a GBM alkotó fehérjék turnover-éről pontosította ismereteinket, igazolva azt a régi feltételezést, mely szerint a core fehérjék hosszabb, míg a felszíni lamina rara fehérjék rövidebb élettartammal bírnak (P. Liu és mtsai., 2020).

A tömegspektrometria módszernek azonban nem csak a kísérletes kutatás látja hasznát. Az suPAR-al kapcsolatos ígéretes állatkísérletes eredmények (Wei és mtsai., 2011) után, a klinikai gyakorlatban a várakozások csak részben igazolódtak (Jefferson & Alpers, 2013). A kutatások tovább folynak a veseátültetést követően visszatérő FSGS-t potenciálisan közvetítő új, lehetséges keringő faktor azonosítása érdekében. Szintén MS-technikát alkalmazva rekurrens FSGS betegek szérumból proteinA-immunadsorbens technikával kivont frakcióban Ca/calmodulin dependens szerin protein kináz (CASK)-t, mint új, lehetséges keringő faktort emelték ki (Beaudreuil és mtsai., 2019). Több független munkacsoport a vizelet üledék MS elemzésével az FSGS és MCD differenciálására alkalmas jellemző fehérje mintázatot írt le, ami a klinikai diagnózis alkotásban hatalmas előrelépést jelenthet (J.-E. Lee és mtsai., 2016; Y. Wang és mtsai., 2017).

A humán glomeruláris ECM biológia alapjait az e téren a MS alapú proteomikai vizsgálatok úttörői, Yoshida és Cui kutatók nevével fémjelzett közlemények fektették le Tashida Yamamoto munkacsoportjából 2005-től kezdve (Z. Cui és mtsai., 2013; Yoshida és mtsai., 2005). Az eddigi legszélesebb körű analízist azonban 2014-ben a Rachel Lennon-munkacsoport végezte, akik humán glomerulusok ECM alkotó fehérjéire feldúsított minta MS-alapú vizsgálatával 144 glomeruláris ECM-specifikus, strukturális és szabályozó fehérjét azonosítottak. A teljesség igénye nélkül érdemes megemlíteni az *alpmembrán alkotók* közt a kollagének, lamininek, agrin, fibulin, fibrillin, fibronectin, nidogének, TINAG és von Willebrand faktor A-t; a *strukturális ECM fehérjék* között asporin, biglikán, fibrinogén láncok, periostin, nefronectin, TINAGL1, vitronectin, valamint egy *további ECM-kapcsolt fehérje csoportba* sorolt pl. clusterin, kininogén, számos szerin proteáz SERPIN és komplement elemek jelenlétét. Ez a vizsgálat jó alappal szolgál a glomeruláris mátrix összetételének, komplexitásának és dinamikus változékonyságának vizsgálatához mind fiziológiás (pl. fejlődés vizsgálatokban), mind patológiás körülmények között. Az itt (és a mi vizsgálatunkban is) használt többlépcsős ECM fehérje feldúsítási módszerrel két egészséges, de különböző genetikai hátterű

egértörzs glomeruláris ECM-jét elemezve progresszív nephropátiára hajlamosító génexpressziós mintázatokat (netrin 4, fibroblast növekedési faktor 2, tenascin C, kollagén I, meprin 1a és 1b) írtak le. A glomerulopátia-hajlam hátterében a mátrix metalloproteázok, máj X-receptor/retinoid X-receptor, Nrf2, Notch és a ciklin-függő kináz 5-el kapcsolatos ECM szabályozó útvonalak gátlását feltételezik (Randles és mtsai., 2015).

Eredményeink megbeszélése előtt ismertetem a vizsgált modellünket. Vizsgálatunk tárgya a miR-193a túlexpresszálo genetikailag módosított egér volt, amely a genetikai okból kialakult podocita vesztéssel meghatározott FSGS-ek csoportjába sorolható. Modellünkben a FSGS kialakulására nézve már tisztázott ismeretekre támaszkodtunk, amelyeket az alábbiakban röviden ismertetek. Ez lehetővé tette számunkra, hogy egy előrehaladott stádiumnak megfelelő időpontot választva megvizsgáljuk az ECM összetételét elsődleges FSGS-ben.

Az először 1993-ban azonosított, a genomban található gének 1%-át alkotó, 18-25 nukleotid hosszúságú mikro RNS-ek (miRNS) nem kódoló, hanem RNS interferencia indukálásával a poszt-transzkripcionális génexpresszió szabályozásban résztvevő RNS-ek. Egyetlen miRNS hatással lehet számos gén expressziójára, ezáltal betegség-specifikus útvonalak és jelátviteli kaszkádok szabályozásával egy teljes patológiai folyamatot befolyásolhatnak.

Munkacsoportunk tagjai a miR193a-t korábban egy emlő tumorgenezist szabályozó miRNS-eket kereső vizsgálatában észlelték, ezért egy doxiciklinnel szabályozható citomegalovírus (CMV)-tet promoter típusú (Seibler és mtsai., 2007) genetikailag módosított egeret hoztak létre, amelyben a miR-193a génexpresszió több, mint tízszeresére nő az indukció alatt (Gebeshuber és mtsai., 2013). A tetraciklin-kontrollált transzkripció aktiváció elvét kihasználó (Izd. Tet-On) genetikailag módosított modellekben az ivóvízben adagolt doxiciklin a feltétele az erre érzékenyített (TRE-t tartalmazó promoterral ellátott) génszakasz kifejeződésének, vagyis doxiciklin hiányában nincs transzkripció. Fentiek alapján nyilvánvaló, hogy ez esetben a doxiciklint nem az antibiotikus hatása, sem nem egyéb farmakológiai tulajdonságai miatt alkalmazzuk. A létrehozott egértörzs karakterizálása során kiderült, hogy a miR-193a túlexpresszió elsődlegesen a podocitákat érinti, csekély mértékben a PECs és disztális tubulus sejtekben is észlelhető, nem érinti azonban a mezangiális, az interstícium vérereit és a proximális

tubulus sejteket. A miR-193a-túlexpresszázó egerek az indukció 2. hetétől kezdve EM-val, majd a 4. héttől már FM-al is követhető veseszöveti változásokon mennek át, miközben más szervi megjelenés nem észlelhető. A növekvő albuminuriával járó progresszív glomeruláris léziókkal, tubuláris atrófiával, hegesedéssel, ciszta képződéssel és fokális tubuláris regenerációval jellemezhető vesebetegség homozigótákban ~6, heterozigótákban ~12 hét alatt súlyos renális cachexia képében elhulláshoz vezet. Molekuláris biológiai vizsgálatok igazolták, hogy a miR-193a targetje a podocita differenciáció és homeosztázis mester regulátoraként ismert transzkripciós faktor, a Wilms' tumor 1 (*WT1*) fehérje. Így a miR-193a túlexpresszió a *WT1* leszabályozásával, a *WT1* célpontok (*Podxl*, *Nphs1*(*nefrin*), *Notch*, *Vegfa*) és más résdiafragma fehérjék (*Nphs2* (*podocin*), *Cd2ap*, *Inf2*) expresszió csökkenése, valamint *Bbox1*, *Spp1* (*osteopontin*), *UMOD* (*uromodulin*) fokozott kifejeződése nyomán a podocita szerkezet súlyos zavara útján vezet FSGS-nek megfelelő klinikai képhez (Gebeshuber és mtsai., 2013).

Jelen vizsgálatunkban a miR-193a túlexpresszióval indukált FSGS-ben az ECM változásai közt legszembetűnőbb az **akut fázis válasz erős aktivációja** volt, ideértve a **komplement komponensek, fibrinogén útvonal és véralvadási kaszkád elemeinek** fokozott jelenlétét.

A komplement rendszer a veleszületett immunitás egyik alappillére, amely nem csupán a kórokozókkal szembeni első vonalbeli védelemben, hanem olyan alapvető fiziológias folyamatok szabályozásában is fontos szerepet játszik, mint az angiogenezis vagy a véralvadási rendszer. Eszköztárában szerepelnek az opszonizáció, az immun komplexek és az apoptotikus sejtörmelék eltávolítása, a kemoattraktánsok termelése és a gyulladós sejtek behívása vazodilatáció útján, valamint az adaptív T- és B-sejt válasz felé közvetítő funkciója (Tan & Zhao, 2018). Korábban kimutatták, hogy a komplement rendszer aktiválódik FSGS-ben szenvedő betegekben, elősegíti a gyulladást és hozzájárul az FSGS előrehaladásához (Strassheim és mtsai., 2013; Thurman és mtsai., 2015), valamint ha a C4D lerakódik a mezangiumban, akkor a primer FSGS-ben szenvedő betegek túlélési esélyei romlanak (Heybeli és mtsai., 2019). Modellünkben a C1, C4B, komplement elemeket és a rendszer szabályozásában résztvevő CFP megjelenését és CRP feldúsulását azonosítottuk.



Az FSGS ECM mintáinkban a **hemoglobin láncok** ( $\alpha$ -globin (HBA1),  $\beta$ 1-globin (HBB-B1) és  $\beta$ 2-globin (HBB-B2)) egyöntetű, jelentősen megnövekedett előfordulását figyeltük meg. Feltételezhető, hogy ennek háttérében a komplement kaskád túlzott aktivitása által okozott vörösvérsejt-szétesés (lízis) állhat, ami egyidejű **reaktív oxigén gyökök (ROS)** képződés révén további károsodásokhoz vezethet. Ismert, hogy a ROS különböző mechanizmusokkal elősegíti az FSGS kialakulását, többek között az apoptózis stimulációjával, vagy a TRPC6 tranziens receptor potenciál kationcsatorna expressziójának serkentésével (Z. Wang és mtsai., 2009). Az uromodulin szintén a veleszületett immunrendszer része, kimutatták kötődését komplement komponensekhez és különféle citokinekhez (H. Wang és mtsai., 2018).

Egy másik jellegzetes jelátviteli útvonal, a **fibrinogén útvonal**, amelyik a szervezet bármely pontján bekövetkezett sérülést követően általában a legelső között aktiválódik, és a komplement rendszerrel is kölcsönhatásba lép (Amara és mtsai., 2008; Auger és mtsai., 2012; Subramaniam és mtsai., 2017). A **fibrinogén** fokozott működését az indukált FSGS modellünkben szintén a legkifejezettebb eltérések egyikének észleltük.

A komplement komponensekhez hasonlóan a fibrinogén is főként a májban termelődik, és központi szerepet játszik a véralvadásban, a gyulladás szabályozásában, a citokinek expressziójában, a fibrózisban és az apoptózisban (Banas és mtsai., 2008; Rubel és mtsai., 2001; Sörensen és mtsai., 2011). A fibrinogén a Toll-like 4 receptorhoz (TLR4) kötődéssel képes szabályozni a podocita homeosztázisát, stimulálva ezzel a p38 foszforilációját és az NF $\kappa$ B aktivációját (H. Wang és mtsai., 2018). Egy nemrégiben közölt, lipopoliszachariddal indukált szeptikus akut vesekárosodás vizsgálatban szintén a C3 komplement és a fibrinogén láncok fehérje expressziójának növekedését találták legkifejezettebb eltérésnek (Róka és mtsai., 2020), ami arra utal, hogy az akut fázis válasz a vesekárosodásra adott **általános reakció lehet**.

A miR-193a túlexpresszióval indukált FSGS-ben szenvedő egerek glomeruláris ECM vizsgálata során **több olyan fehérje jelenlétét is azonosítottuk, amelyek a kontrollban nem voltak megtalálhatóak** és korábban az FSGS-el sem hozták azokat összefüggésbe. Így a veleszületett immunválaszban és az immunoglobulin A (IgA) szállításában is szereplő polimer immunoglobulin receptort (PIGR) kizárólag az FSGS mintákban detektáltuk. Érdekes módon, a PIGR szerepét már IgA nefritiszben is leírták és ismert, hogy expresszióját a TLR4 receptor is szabályozza, bár ennek az

összefüggésnek a részletei még nem egyértelműek (Narita és mtsai., 2001; Schneeman és mtsai., 2005). A veleszületett immunválasz egy másik szereplőjét, az SFTPD-t szintén csak az indukált FSGS ECM-ban tudtuk kimutatni, amelynek szerepét tovább kell vizsgálni. A fentiekhez hasonlóan a már részletezett komplement aktivátor fehérje CFP és az alábbiakban kifejtett ITIH1 megjelenése is csupán az FSGS-re jellemző eltérés volt.

Számos **proteáz** (ITIH1, SERPINA1, SERPINA3) fokozott expresszióját észleltük, amelyek képesek az ECM komponensek megújulását illetve degradációjának ütemét (turnoverét) irányítani, ezért központi jelentőséggel bírnak a szklerotikus folyamatban. Egyidejűleg az akut fázis válaszban is szerepelnek, például a véralvadási kaszkád részét képező SERPINA1 (Svirid és mtsai., 2017).

Ismert, hogy a megváltozott lipid anyagcsere egyes komponensei több, különböző útvonalon keresztül károsíthatják a podocitákat (Fornoni és mtsai., 2014; Herman-Edelstein és mtsai., 2014). A HDL APO1 mennyisége szintén megnőtt az indukált FSGS-ben. Az APOA1 elősegítheti a koleszterin kiáramlását, amely podocita károsító hatású lehet (Herman-Edelstein és mtsai., 2014), illetve az APOA1 nagy molekulatömegű formája az egyik feltételezett keringő mediátora a visszatérő (recurrent) FSGS-nek (Lopez-Hellin és mtsai., 2013; Puig-Gay és mtsai., 2019). Az APOL1 és APOA1 közötti kötődés szerepét szintén összefüggésbe hozták az FSGS-sel (Freedman és mtsai., 2010).

A tömegspektrometriás (MS) vizsgálattal kis mennyiségű, gyenge ECM kapcsolódással bíró vagy más okból esetleg észrevétlenül maradt, azonban az FSGS-ben potenciálisan szereppel bíró további ECM-asszociált fehérjék felkutatása érdekében fehérje szintű vizsgálatunk adatait egér-ember összehasonlítással, glomeruláris génextpresszió szintű kereséssel egészítettük ki. A munkacsoportunk által korábban közölt miR-193a túlexpresszióval indukált FSGS egér (Gebeshuber és mtsai., 2013) és mások által közölt idiopathiás FSGS-ban szenvedő humán glomerulusok (Bennett és mtsai., 2007) RNS profiljának összevetésével több, mint háromszoros mértékben változott kifejeződésű géneket kerestünk. mRNS szinten **32 túl- és 5 alulszabályozott, ECM-kapcsolt, az FSGS patomechanizmusában potenciálisan jelentős génre** találtunk. A fehérje szintű eredményekkel közös találat a vesében az immunrendszer szabályozásáért és citokin termeléséért felelős uromodulin (UMOD) és a mátrix fehérje homeosztázisban és az alvadási rendszerben szereplő SERPINA1 volt, valamint a komplement rendszer és a véralvadási kaszkád elemeinek szerepe körvonalazódott. Az FSGS-es betegek

glomeruláris mRNS profiljában a legnagyobb növekedést az osteopontin, egy szekretált glikofoszfoprotein mutatta, amely az immunrendszer és az FSGS szempontjából számos rendkívül fontos jelátviteli folyamatot képes szabályozni, beleértve az interleukineket, NFkB, TGF- $\beta$  és CD44 (Icer & Gezmen-Karadag, 2018). Magas osteopontin-szintet már korábban is leírtak egér adriamycin nefropátia modellben és FSGS-es betegekben is (Shui és mtsai., 2007; Wasilewska és mtsai., 2011). Az analízisünkben erőteljesen túlszabályozott IGFBP1 és IGFBP3 géneket korábban már a DN és a krónikus vesebetegség markereinek javasolták (Al Shawaf és mtsai., 2019; Sayanthooran és mtsai., 2017). Ezen kívül számos olyan gént találtunk, amelyek a Wnt és a TGF- $\beta$  útvonalakhoz kapcsolódnak, és amelyek mind az FSGS, mind az ECM biológia vonatkozásában ismert szereppel bírnak (Al Shawaf és mtsai., 2019; Cisternas és mtsai., 2014; Dai és mtsai., 2009; H. S. Lee, 2012; Sayanthooran és mtsai., 2017).

A jövőben a komplement, a fibrinogén és a véralvadással kapcsolatos útvonalak terápiás megközelítése új, fokozott figyelmet kell, hogy nyerjen a primer FSGS terápiája érdekében. Az irodalomban már ismert egy, a trombin-aktivált fibrinolízis gátlószert (TAFI) alkalmazó farmakointervenció kísérlet, amely a vese fibrózisra kedvező hatású volt (Atkinson és mtsai., 2013).

## 6. Következtetések

Két állatkísérletes modell vizsgálata során kapott eredményeink alapján a következő megállapításokat tesszük a glomerulopátia patomechanizmusáról:

A 20 hetes zsírdús diéta etetés és egyszeri, kis dózisu streptozotocin injekció következtében *enyhe szénhidrát anyagcserezavarú, elhízott Long Evans patkányban*

- (1) Az obezitással és prediabetésszel összefüggő szervkárosodás morfológiai és funkcionális jelei a szívben és a májban korábban jelentkeznek, mint a vesében.
- (2) A modellünkben az elhízással összefüggő vesekárosodás legkorábbi jeleinek értékelhetők a glomeruláris extracelluláris mátrix átépülésének részeként a kollagén IV megnövekedett aránya, illetve a tubuláris érintettséget már a vesefunkció romlást megelőzően jelző Lcn2 (NGAL) mRNS expresszió növekedése.
- (3) A krónikusan magas plazma leptin koncentráció önmagában nem okoz obezitással összefüggő vesekárosodást, glomeruloszklerózist vagy tubulointersticiális fibrózist.
- (4) A jelentős elhízás ellenére - a szakirodalomban egyedülállóan tapasztalt - diszlipidémia, és a zsírszöveti és szisztémás gyulladás hiánya arra utal, hogy az elhízott, kezdődő szénhidrát-anyagcsere zavarban kialakuló vesekárosodás a fenti tényezőkkel szoros kóroki összefüggésben áll. A Long Evans patkánytörzs alkalmas lehet a vesekárosodással szembeni relatív rezisztencia mechanizmusának a vizsgálatára.

*A miR-193a túlexpresszióval indukált, előrehaladott FSGS egér modellben a glomeruláris extracelluláris fehérjék vizsgálatával*

- (5) több, mint 60, részben már ismert és számos új, eddigiekben az FSGS témakörében nem tárgyalt, megváltozott expressziójú gént mutattunk ki, valamint
- (6) kizárólag az FSGS-ben észlelhető fehérjeként a properdint (CFP), inter- $\alpha$ -tripszin inhibitor 1-t (ITI1), polimer immunglobulin receptort (PIGR) és a pulmonáris surfactan-asszociált protein D-t (SFTPD) azonosítottuk.
- (7) Az FSGS patomechanizmus szempontjából legjelentősebb változások a komplement rendszert, a fibrinogén útvonalat, a véralvadási kaszkád elemeit, és néhány, az ECM turnoverét potenciálisan szabályozó proteáz gátlót érintik. A felsorolt tényezők fokozott figyelmet érdemelnek egy jövőben kidolgozandó primer FSGS terápia érdekében.

## 7. Összefoglalás

A vesefibrózis a krónikus vesebetegség (CKD) progresszióját az etiológiától függetlenül meghatározó közös, részleteiben nem kellően ismert, ezért terápiásan alig uralható tényezője a CKD patomechanizmusának. A CKD jelentős hányadát a magasvérnyomás és a cukorbetegség okozta másodlagos glomerulopátiák és az elsődleges glomerulonefritiszek közt leggyakoribb, világszerte növekvő előfordulású fokális szegmentális glomeruloszklerózis (FSGS) adják. Bár az FSGS kialakulását a podocita károsodása idézi elő, az ezt követő glomeruloszklerózis progresszióját főleg a többi glomeruláris sejtípus következményes működési zavara, és egyéb károsító tényezők határozzák meg. Célunk a glomerulopátia patomechanizmusának tanulmányozása volt két különböző etiológiájú, egy kezdeti és egy előrehaladott stádiumú állatkísérletben. A *kezdődő szénhidrátanyagcsere zavarral bíró, elhízott patkányban* a glomerulopátia korai jeleit és a vese és más szervek károsodásának viszonyát vizsgáltuk. Az azonos modellen kimutatott kismértékű szív és májszöveti patológiás változásokhoz képest enyhe vesekárosodást tapasztaltunk. Az obez, prediabéteszes csoportban rutin szövettani kiértékeléssel intakt vesemorfológiát, plazma és vizelet-vizsgálatok alapján megtartott vesefunkciót észleltünk. Az immunhisztokémiai és génexpressziós vizsgálataink azonban a veseérintettség legkorábbi eltéréseinek értékelhető glomeruláris kollagén IV fehérje felhalmozódást, és megnövekedett tubuláris Lcn2 mRNS expressziót mutattak ki. Az előbbit az extracelluláris mátrix lelassult degradációnak tulajdonítjuk, az Lcn2 a tubulus károsodás markerének tekinthető. Meglepő, hogy a krónikusan magas plazma leptin koncentráció nem okozott vesefibrózist. Az enyhe vesekárosodást a modellben egyedülállóan megfigyelhető szisztémás és lokális gyulladás, és diszlipidémia hiányával magyarázzuk. A *miR-193a túlexpresszióval indukált, előrehaladott FSGS egér modellben* a glomeruláris extracelluláris fehérjék tömegspektrometriai vizsgálatát az egér-ember glomeruláris génexpresszió mintázat összehasonlításával kiegészítve összesen több, mint 60, részben már ismert és számos új, eddigiekben az FSGS-ben nem tárgyalt gént azonosítottunk. A kombinált, multiplex megközelítés olyan, az FSGS patomechanizmusában fontos folyamatok szerepére mutatott rá, mint a komplement rendszer, a fibrinogén útvonal, a véralvadási kaszkád és az ECM turnoverét szabályozó proteáz gátlók, amelyek, mint lehetséges terápiás célpontok, a jövőben fokozott figyelmet érdemelnek a primer FSGS terápiája érdekében.

## 8. Summary

Renal fibrosis, regardless of its etiology, is the final common factor in the progression of chronic kidney disease (CKD). The mechanisms of fibrosis are not well known in detail to date; therefore, fibrosis cannot be directly treated with drugs. A significant proportion of CKDs involves secondary glomerulopathies (caused by hypertension or diabetes) and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), the most common one among all primary glomerulonephritis with increasing occurrence worldwide. Although FSGS is initiated by podocyte damage, the progression of the subsequent glomerulosclerosis is mainly determined by consequent dysfunction of other glomerular cell types and by other damaging factors. Our aim was to study the pathomechanism of glomerulopathy in two animal models of different etiologies, at an initial and an advanced stage. In *an obese rat model with a mild glucose metabolism disorder*, we examined the early signs of glomerulopathy and its severity was compared to those of other organs. In light of the moderate pathological changes detected in the cardiac and liver tissue in the same model, we observed surprisingly subtle renal damage. In the obese, prediabetic group, intact renal morphology and preserved renal function were detected. However, our immunohistochemical and gene expression studies revealed glomerular collagen IV protein accumulation and increased tubular Lcn2 mRNA expression, which can be considered the earliest markers of renal involvement. The former can be attributed to slower degradation of the extracellular matrix, while Lcn2 can be considered as a marker of altered tubular function. Surprisingly, chronically elevated plasma leptin concentrations did not cause renal fibrosis. We suppose that the absence of systemic and local inflammation, together with the lack of dyslipidemia account for the mild renal impairment, a unique observation that seems to be restricted to the Long Evans rat strain. In the *miR-193a overexpression-induced, advanced FSGS mouse model*, mass spectrometric analysis of glomerular extracellular matrix proteins completed with the comparison of mouse and human glomerular gene expression patterns revealed more than 60 genes, potentially of pathologic relevance, partly known and partly not-yet linked to FSGS progression. Our complex, multiplex approach pointed to the significance of complement system, fibrinogen pathway, coagulation cascade and ECM turnover regulating serine protease system, which must receive enhanced attention as potential therapeutic targets of primary FSGS in the future.

## 9. Irodalomjegyzék

- Adler, S., Baker, P. J., Johnson, R. J., Ochi, R. F., Pritzl, P., & Couser, W. G. (1986). Complement membrane attack complex stimulates production of reactive oxygen metabolites by cultured rat mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 77(3), 762–767. <https://doi.org/10.1172/JCI112372>
- Al Shawaf, E., Abu-Farha, M., Devarajan, S., Alsairafi, Z., Al-Khairi, I., Cherian, P., Ali, H., Mathur, A., Al-Mulla, F., Al Attar, A., & Abubaker, J. (2019). ANGPTL4: A Predictive Marker for Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4943191>
- Alicic, R. Z., Rooney, M. T., & Tuttle, K. R. (2017). Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(12), 2032–2045. <https://doi.org/10.2215/CJN.11491116>
- Alpers, C. E., & Hudkins, K. L. (2011). Mouse models of diabetic nephropathy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(3), 278–284. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283451901>
- Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J. D., & Huber-Lang, M. (2008). Interaction between the coagulation and complement system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 632(Davis 2004), 71–79. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78952-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78952-1_6)
- Andrighetto, S., Leventhal, J., Zaza, G., & Cravedi, P. (2019). Complement and complement targeting therapies in glomerular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246336>
- Arapović, A., Vukojević, K., Filipović, N., Glavina Durdov, M., Ljubanović-Galešić, D., Saraga-Babić, M., Prgomet, S., Simičić Majce, A., Belavić, A., Borić Škaro, D., Ljutić, D., & Saraga, M. (2020). Epidemiology of 10-year paediatric renal biopsies in the region of southern Croatia. *BMC nephrology*, 21(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01727-7>
- Atkinson, J. M., Pullen, N., & Johnson, T. S. (2013). An inhibitor of thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI) can reduce extracellular matrix accumulation in an in vitro model of glucose induced ECM expansion. *Matrix Biology*, 32(5), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.01.006>
- Auger, J. L., Haasken, S., & Binstadt, B. A. (2012). Autoantibody-mediated arthritis in

- the absence of C3 and activating Fcγ receptors: C5 is activated by the coagulation cascade. *Arthritis Research and Therapy*, 14(6), R269. <https://doi.org/10.1186/ar4117>
- Balaban, R. S., & Mandel, L. J. (1988). Metabolic substrate utilization by rabbit proximal tubule. An NADH fluorescence study. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, 254(3), 407–416. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1988.254.3.f407>
- Banas, M. C., Banas, B., Hudkins, K. L., Wietecha, T. A., Iyoda, M., Bock, E., Hauser, P., Pippin, J. W., Shankland, S. J., Smith, K. D., Stoelcker, B., Liu, G., Gröne, H. J., Krämer, B. K., & Alpers, C. E. (2008). TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(4), 704–713. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007040395>
- Barber, T., Vina, J. R., Vinat, J., & Cabo, J. (1985). Decreased urea synthesis in cafeteria-diet-induced obesity in the rat. In *Biochem. J* (Köt. 230).
- Barisoni, L., Bruggeman, L. A., Mundel, P., D'Agati, V. D., & Klotman, P. E. (2000). HIV-1 induces renal epithelial dedifferentiation in a transgenic model of HIV-associated nephropathy. *Kidney International*, 58(1), 173–181. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00152.x>
- Barrière, D. A., Noll, C., Roussy, G., Lizotte, F., Kessai, A., Kirby, K., Belleville, K., Beaudet, N., Longpré, J.-M., Carpentier, A. C., Geraldès, P., & Sarret, P. (2018). Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Scientific Reports*, 8(1), 424. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18896-5>
- Beaudreuil, S., Zhang, X., Herr, F., Harper, F., Candelier, J. J., Fan, Y., Yeter, H., Dudreuilh, C., Lecru, L., Vazquez, A., Charpentier, B., Lorenzo, H. K., & Durrbach, A. (2019). Circulating CASK is associated with recurrent focal segmental glomerulosclerosis after transplantation. *PLOS ONE*, 14(7), e0219353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219353>
- Beddhu, S., Pappas, L. M., Ramkumar, N., & Samore, M. (2003). Effects of body size and body composition on survival in hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(9), 2366–2372. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000083905.72794.e6>



- Bennett, M. R., Czech, K. A., Arend, L. J., Witte, D. P., Devarajan, P., & Potter, S. S. (2007). Laser capture microdissection-microarray analysis of focal segmental glomerulosclerosis glomeruli. *Nephron - Experimental Nephrology*, *107*(1). <https://doi.org/10.1159/000106775>
- Bhandari, U., Kumar, V., Kumar, P., Tripathi, C., & Khanna, G. (2015). Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low-dose streptozotocin & high-fat diet-induced type-2 diabetes in rats. *Indian Journal of Medical Research*, *142*(5), 598. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.171290>
- Binder, C. J., Weiher, H., Exner, M., & Kerjaschki, D. (1999). Glomerular overproduction of oxygen radicals in Mpv17 gene-inactivated mice causes podocyte foot process flattening and proteinuria. A model of steroid-resistant nephrosis sensitive to radical scavenger therapy. *American Journal of Pathology*, *154*(4), 1067–1075. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65359-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65359-X)
- Bobulescu, I. A. (2010). Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *19*(4), 393–402. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac>
- Bock, F., Shahzad, K., Wang, H., Stoyanov, S., Wolter, J., Dong, W., Pelicci, P. G., Kashif, M., Ranjan, S., Schmidt, S., Ritzel, R., Schwenger, V., Reymann, K. G., Esmon, C. T., Madhusudhan, T., Nawroth, P. P., & Isermann, B. (2013). Activated protein C ameliorates diabetic nephropathy by epigenetically inhibiting the redox enzyme p66Shc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(2), 648–653. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218667110>
- Boden, G., Song, W., Kresge, K., Mozzoli, M., & Cheung, P. (2008). Effects of hyperinsulinemia on hepatic metalloproteinases and their tissue inhibitors. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *295*(3). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90370.2008>
- Boden, G., & Song, W. W. (2008). Effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases. *Current Diabetes Reports*, *8*(3), 239–242. <https://doi.org/10.1007/s11892-008-0041-y>
- Börgeson, E., Johnson, A. M. F., Lee, Y. S., Till, A., Syed, G. H., Ali-Shah, S. T., Guiry, P. J., Dalli, J., Colas, R. A., Serhan, C. N., Sharma, K., & Godson, C. (2015). Lipoxin A4 Attenuates Obesity-Induced Adipose Inflammation and Associated Liver and

- Kidney Disease. *Cell Metabolism*, 22(1), 125–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.003>
- Brenner, B. M. (1985). Nephron adaptation to renal injury or ablation. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, 18(3), F324–F337.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1985.249.3.f324>
- Brenner, Barry M., Lawler, E. V., & Mackenzie, H. S. (1996). The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. *Kidney International*, 49(6), 1774–1777.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1996.265>
- Brown, L., & Panchal, S. K. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.  
<https://doi.org/10.1155/2011/351982>
- Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. In *Obesity* (Köt. 15, Szám 4, o. 798–808). <https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>
- Bukosza, E. N., Kornauth, C., Hummel, K., Schachner, H., Huttary, N., Krieger, S., Nöbauer, K., Oszwald, A., Fazeli, E. R., Kratochwill, K., Aufrecht, C., Szénási, G., Hamar, P., & Gebeshuber, C. A. (2020). ECM characterization reveals a massive activation of acute phase response during FSGS. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062095>
- Byron, A., Randles, M. J., Humphries, J. D., Mironov, A., Hamidi, H., Harris, S., Mathieson, P. W., Saleem, M. A., Satchell, S. C., Zent, R., Humphries, M. J., & Lennon, R. (2014). Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 953–966. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013070795>
- Cammisotto, P. G., & Bendayan, M. (2008). Adiponectin stimulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase  $\alpha$  in renal glomeruli. *Journal of Molecular Histology*, 39(6), 579–584. <https://doi.org/10.1007/s10735-008-9198-6>
- Chang, A. M., Ohse, T., Krofft, R. D., Wu, J. S., Eddy, A. A., Pippin, J. W., & Shankland, S. J. (2012). Albumin-induced apoptosis of glomerular parietal epithelial cells is modulated by extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27(4), 1330–1343.

- <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr483>
- Chao, P.-C., Li, Y., Chang, C.-H., Shieh, J. P., Cheng, J.-T., & Cheng, K.-C. (2018). Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *101*, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.084>
- Chen, M., Jayne, D. R. W., & Zhao, M.-H. (2017). Complement in ANCA-associated vasculitis: mechanisms and implications for management. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.37>
- Cheung, Y. M., Joham, A., Marks, S., & Teede, H. (2017). The obesity paradox: an endocrine perspective. In *Internal Medicine Journal* (Köt. 47, Szám 7, o. 727–733). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/imj.13257>
- Choi, K. M., Lee, J., Lee, K. W., Seo, J. A., Oh, J. H., Kim, S. G., Kim, N. H., Choi, D. S., & Baik, S. H. (2004). Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clinical endocrinology*, *61*(1), 75–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02063.x>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.*, *15*(3), 532–534, 536-7.
- Cisternas, P., Vio, C. P., & Inestrosa, N. C. (2014). Role of Wnt Signaling in Tissue Fibrosis, Lessons from Skeletal Muscle and Kidney. *Current Molecular Medicine*, *14*(4), 510–522. <https://doi.org/10.2174/1566524014666140414210346>
- Covic, A., Schiller, A., Volovat, C., Gluhovschi, G., Gusbeth-Tatomir, P., Petrica, L., Caruntu, I.-D., Bozdog, G., Velciov, S., Trandafirescu, V., Bob, F., & Gluhovschi, C. (2006). Epidemiology of renal disease in Romania: a 10 year review of two regional renal biopsy databases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *21*(2), 419–424. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi207>
- Cui, W., Maimaitiyiming, H., Qi, X., Norman, H., & Wang, S. (2013). Thrombospondin 1 mediates renal dysfunction in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *305*(6), 871–880. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00209.2013>
- Cui, Z., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Nameta, M., Magdeldin, S., Makiguchi, T.,

- Ikoma, T., Fujinaka, H., Yaoita, E., & Yamamoto, T. (2013). Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. *Proteome Science*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-13>
- D'Agati, V. D., Chagnac, A., De Vries, A. P. J., Levi, M., Porrini, E., Herman-Edelstein, M., & Praga, M. (2016). Obesity-related glomerulopathy: Clinical and pathologic characteristics and pathogenesis. *Nature Reviews Nephrology*, *12*(8), 453–471. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.75>
- D'Agati, V. D., Fogo, A. B., Bruijn, J. A., & Jennette, J. C. (2004). Pathologic Classification of Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Working Proposal. *American Journal of Kidney Diseases*, *43*(2), 368–382. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2003.10.024>
- D'Agati, V. D., Kaskel, F. J., & Falk, R. J. (2011). Focal segmental glomerulosclerosis. In *New England Journal of Medicine* (Köt. 365, Szám 25, o. 2398–2411). <https://doi.org/10.1056/NEJMra1106556>
- Dai, C., Stolz, D. B., Kiss, L. P., Monga, S. P., Holzman, L. B., & Liu, Y. (2009). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *Journal of the American Society of Nephrology*, *20*(9), 1997–2008. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009010019>
- De Vries, A. P. J., & Rabelink, T. J. (2013). A possible role of cystatin C in adipose tissue homeostasis may impact kidney function estimation in metabolic syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *28*(7), 1628–1630. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs571>
- De Vries, A. P. J., Ruggenenti, P., Ruan, X. Z., Praga, M., Cruzado, J. M., Bajema, I. M., D'Agati, V. D., Lamb, H. J., Barlovic, D. P., Hojs, R., Abbate, M., Rodriguez, R., Mogensen, C. E., & Porrini, E. (2014). Fatty kidney: Emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. In *The Lancet Diabetes and Endocrinology* (Köt. 2, Szám 5, o. 417–426). Elsevier Limited. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70065-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70065-8)
- Declèves, A. E., Mathew, A. V., Cunard, R., & Sharma, K. (2011). AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet. *Journal of the American Society of Nephrology*, *22*(10), 1846–1855. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010026>

- Declèves, A. E., Zolkipli, Z., Satriano, J., Wang, L., Nakayama, T., Rogac, M., Le, T. P., Nortier, J. L., Farquhar, M. G., Naviaux, R. K., & Sharma, K. (2014). Regulation of lipid accumulation by AMK-Activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney International*, 85(3), 611–623. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.462>
- Deji, N., Kume, S., Araki, S., Soumura, M., Sugimoto, T., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sakaguchi, M., Koya, D., Haneda, M., Kashiwagi, A., & Uzu, T. (2009). Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296, 118–126. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00110.2008>.-Metabolic
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Dragovic, D., Rosenstock, J. L., Wahl, S. J., Panagopoulos, G., DeVita, M. V., & Michelis, M. F. (2005). Increasing incidence of focal segmental glomerulosclerosis and an examination of demographic patterns. *Clinical nephrology*, 63(1), 1–7. <https://doi.org/10.5414/cnp63001>
- Dunn, C. (2016). Scottish Renal Registry Report 2016. *Scottish Renal Registry Report*. <http://www.srr.scot.nhs.uk/Publications/docs/scottish-renal-registry-report-2016-web.pdf?34>
- Elshahat, S., Cockwell, P., Maxwell, A. P., Griffin, M., O'Brien, T., & O'Neill, C. (2020). The impact of chronic kidney disease on developed countries from a health economics perspective: A systematic scoping review. *PLoS ONE*, 15(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230512>
- Eremina, V., Jefferson, J. A., Kowalewska, J., Hochster, H., Haas, M., Weisstuch, J., Richardson, C., Kopp, J. B., Kabir, M. G., Backx, P. H., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Barisoni, L., Alpers, C. E., & Quaggin, S. E. (2008). VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine*, 358(11), 1129–1136. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707330>
- Fang, F., Liu, G. C., Kim, C., Yassa, R., Zhou, J., & Scholey, J. W. (2013). Adiponectin attenuates angiotensin II-induced oxidative stress in renal tubular cells through AMPK and cAMP-Epac signal transduction pathways. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304(11), F1366–F1374.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00137.2012>

- Farquhar, M. G., Saito, A., Kerjaschki, D., & Orlando, R. A. (1995). The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 6(1), 35–47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44304.x>
- Feldman, A. M., Combes, A., Wagner, D., Kadakomi, T., Kubota, T., Li, Y. Y., & McTiernan, C. (2000). The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), 537–544. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00600-2](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00600-2)
- Fernandez-Fresnedo, G., Segarra, A., González, E., Alexandru, S., Delgado, R., Ramos, N., Egido, J. S., & Praga, M. (2009). Rituximab treatment of adult patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(8), 1317–1323. <https://doi.org/10.2215/CJN.00570109>
- Flegal, K. M., Kit, B. K., Orpana, H., & Graubard, B. I. (2013). Association of All-Cause Mortality With Overweight and Obesity Using Standard Body Mass Index Categories. *JAMA*, 309(1), 71. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.113905>
- Flick, M. J., Du, X., Witte, D. P., Jiroušková, M., Soloviev, D. A., Busuttil, S. J., Plow, E. F., & Degen, J. L. (2004). Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor  $\alpha$ M $\beta$ 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 113(11), 1596–1606. <https://doi.org/10.1172/JCI200420741>
- Fogo, A. B. (2015). Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Reviews Nephrology*, 11(2), 76–87. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.216>
- Foreman, K. J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., McGaughey, M., Pletcher, M. A., Smith, A. E., Tang, K., Yuan, C. W., Brown, J. C., Friedman, J., He, J., Heuton, K. R., Holmberg, M., Patel, D. J., Reidy, P., Carter, A., Cercy, K., ... Murray, C. J. L. (2018). Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *The Lancet*, 392(10159), 2052–2090. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31694-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31694-5)
- Fornoni, A., Merscher, S., & Kopp, J. B. (2014). Lipid biology of the podocyte-new perspectives offer new opportunities. *Nature Reviews Nephrology*, 10(7), 379–388.

<https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.87>

- Freedman, B. I., Kopp, J. B., Langefeld, C. D., Genovese, G., Friedman, D. J., Nelson, G. W., Winkler, C. A., Bowden, D. W., & Pollak, M. R. (2010). The Apolipoprotein L1 (APOL1) gene and nondiabetic nephropathy in African Americans. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(9), 1422–1426. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010070730>
- Fukuda, A., Chowdhury, M. A., Venkatarreddy, M. P., Wang, S. Q., Nishizono, R., Suzuki, T., Wickman, L. T., Wiggins, J. E., Muchayi, T., Fingar, D., Shedden, K. A., Inoki, K., & Wigg, R. C. (2012). Growth-dependent podocyte failure causes glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(8), 1351–1363. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012030271>
- Fukuda, A., Wickman, L. T., Venkatarreddy, M. P., Sato, Y., Chowdhury, M. A., Wang, S. Q., Shedden, K. A., Dysko, R. C., Wiggins, J. E., & Wiggins, R. C. (2012). Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease. *Kidney international*, 81(1), 40–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937979>
- Gamede, M., Mabuza, L., Ngubane, P., & Khathi, A. (2019). Plant-derived oleanolic acid ameliorates markers associated with non-alcoholic fatty liver disease in a diet-induced pre-diabetes rat model. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 12, 1953–1962. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S218626>
- Gebeshuber, C. A., Kornauth, C., Dong, L., Sierig, R., Seibler, J., Reiss, M., Tauber, S., Bilban, M., Wang, S., Kain, R., Böhmig, G. A., Moeller, M. J., Gröne, H. J., Englert, C., Martinez, J., & Kerjaschki, D. (2013). Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nature Medicine*, 19(4), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nm.3142>
- Gharavi, A. G., Kiryluk, K., Choi, M., Li, Y., Hou, P., Xie, J., Sanna-Cherchi, S., Men, C. J., Julian, B. A., Wyatt, R. J., Novak, J., He, J. C., Wang, H., Lv, J., Zhu, L., Wang, W., Wang, Z., Yasuno, K., Gunel, M., ... Lifton, R. P. (2011). Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature genetics*, 43(4), 321–327. <https://doi.org/10.1038/ng.787>
- Goodship, T. H. J., Cook, H. T., Fakhouri, F., Fervenza, F. C., Frémeaux-Bacchi, V., Kavanagh, D., Nester, C. M., Noris, M., Pickering, M. C., Rodríguez de Córdoba,

- S., Roumenina, L. T., Sethi, S., Smith, R. J. H., Alpers, C. E., Appel, G. B., Ardissino, G., Ariceta, G., Arici, M., Bagga, A., ... Zipfel, P. F. (2017). Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International*, 91(3), 539–551. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.10.005>
- Gou, S.-J., Yuan, J., Wang, C., Zhao, M.-H., & Chen, M. (2013). Alternative Complement Pathway Activation Products in Urine and Kidneys of Patients with ANCA-Associated GN. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(11), 1884–1891. <https://doi.org/10.2215/CJN.02790313>
- Gou, S., Yuan, J., Chen, M., Yu, F., & Zhao, M. (2012). Circulating complement activation in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody – associated vasculitis. *Kidney International*, 83(1), 129–137. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.313>
- Grahammer, F., Wanner, N., & Huber, T. B. (2013). Podocyte regeneration: who can become a podocyte? *The American journal of pathology*, 183(2), 333–335. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.009>
- Gu, J.-W., Wang, J., Stockton, A., Lokitz, B., Henegar, L., & Hall, J. E. (2004). Cytokine gene expression profiles in kidney medulla and cortex of obese hypertensive dogs. *Kidney International*, 66(2), 713–721. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00793.x>
- Guo, W. Y., Zhu, L., Meng, S. J., Shi, S. F., Liu, L. J., Lv, J. C., & Zhang, H. (2017). Mannose-binding lectin levels could predict prognosis in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(11), 3175–3181. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017010076>
- Habib, S. S., Bashir, S., Iqbal, M., Abdelaziz, G. M., Alyahya, R., Alzahrani, G. K., Alangari, S. I., Alrayes, N. A., Alkahtani, D. S., & Alonso-Alonso, M. (2018). Cardiovascular risk and neurocognitive assessment in young adults and their relationship to body adiposity. *Medical Science Monitor*, 24, 7929–7935. <https://doi.org/10.12659/MSM.909914>
- Hallows, K. R., Mount, P. F., Pastor-Soler, N. M., & Power, D. A. (2010). Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, 1067–1077.



- <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00005.2010>.-The HAYASHI, M., MIYANE, K., SENOU, M., ENDOH, D., HIGUCHI, H., NAGAHATA, H., NAKAYAMA, K., KON, Y., & OKUI, T. (2005). Inhibitory Effects of Trientine, a Copper-Chelating Agent, on Induction of DNA Strand Breaks in Kidney Cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) Rats. *Experimental Animals*, 54(5), 403–412. <https://doi.org/10.1538/expanim.54.403>
- Herman-Edelstein, M., Scherzer, P., Tobar, A., Levi, M., & Gafter, U. (2014). Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. *Journal of Lipid Research*, 55(3), 561–572. <https://doi.org/10.1194/jlr.P040501>
- Heybeli, C., Oktan, M. A., Yıldız, S., Ünlü, M., Celik, A., & Sarioglu, S. (2019). Mesangial C4d deposition is independently associated with poor renal survival in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical and Experimental Nephrology*, 23(5), 650–660. <https://doi.org/10.1007/s10157-018-01688-0>
- Hobeika, L., Barati, M. T., Caster, D. J., McLeish, K. R., & Merchant, M. L. (2017). Characterization of glomerular extracellular matrix by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli. *Kidney international*, 91(2), 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.044>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. In *Nature* (Köt. 444, Szám 7121, o. 860–867). <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Huang, Y. M., Wang, H., Wang, C., Chen, M., & Zhao, M. H. (2015). Promotion of hypercoagulability in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis by C5a-induced tissue factor-expressing microparticles and neutrophil extracellular traps. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 67(10), 2780–2790. <https://doi.org/10.1002/art.39239>
- Icer, M. A., & Gezmen-Karadag, M. (2018). The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical Biochemistry*, 59, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003>
- Ichinose, K., Maeshima, Y., Yamamoto, Y., Kinomura, M., Hirokoshi, K., Kitayama, H., Takazawa, Y., Sugiyama, H., Yamasaki, Y., Agata, N., & Makino, H. (2006). 2-(8-Hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) propionic acid, an inhibitor of angiogenesis, ameliorates renal alterations in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes*,

- 55(5), 1232–1242. <https://doi.org/10.2337/db05-1367>
- Ionut, V., Liu, H., Mooradian, V., Castro, A. V. B., Kabir, M., Stefanovski, D., Zheng, D., Kirkman, E. L., & Bergman, R. N. (2010). Novel canine models of obese prediabetes and mild type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(1), E38–E48. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00466.2009>
- Isermann, B., Vinnikov, I. A., Madhusudhan, T., Herzog, S., Kashif, M., Blautzik, J., Corat, M. A. F., Zeier, M., Blessing, E., Oh, J., Gerlitz, B., Berg, D. T., Grinnell, B. W., Chavakis, T., Esmon, C. T., Weiler, H., Bierhaus, A., & Nawroth, P. P. (2007). Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nature medicine*, 13(11), 1349–1358. <https://doi.org/10.1038/nm1667>
- Jane-wit, D., Manes, T. D., Yi, T., Qin, L., Clark, P., Kirkiles-Smith, N. C., Abrahimi, P., Devalliere, J., Moeckel, G., Kulkarni, S., Tellides, G., & Pober, J. S. (2013). Alloantibody and Complement Promote T Cell–Mediated Cardiac Allograft Vasculopathy Through Noncanonical Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling in Endothelial Cells. *Circulation*, 128(23), 2504–2516. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002972>
- Jefferson, J. A., & Alpers, C. E. (2013). ‘suPAR’-exciting times for FSGS. *Nature Reviews Nephrology*, 9(3), 127–128. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.15>
- Jefferson, J. A., & Shankland, S. J. (2014). The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 21(5), 408–416. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2014.05.009>
- Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A. Y. M., & Yang, C. W. (2013). Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382(9888), 260–272. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60687-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X)
- Jiang, T., Liebman, S. E., Lucia, M. S., Li, J., & Levi, M. (2005). Role of altered renal lipid metabolism and the sterol regulatory element binding proteins in the pathogenesis of age-related renal disease. *Kidney International*, 68(6), 2608–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00733.x>
- Johari, T. Y., Ghoneim, M. A., & Moselhy, S. S. (2018). Thyroid profile and LDH

- isoenzymes as prognostic biomarkers for diabetic and/or obese subjects. *African Health Sciences*, 18(3), 697–706. <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i3.28>
- Jokiranta, T. S., Solomon, A., Pangburn, M. K., Zipfel, P. F., & Meri, S. (1999). Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(8), 4590–4596. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510403>
- Kalantar-Zadeh, K., Abbott, K. C., Salahudeen, A. K., Kilpatrick, R. D., & Horwich, T. B. (2005). Survival advantages of obesity in dialysis patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(3), 543–554. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.3.543>
- Kambham, N., Markowitz, G. S., Valeri, A. M., Lin, J., & D'Agati, V. D. (2001). Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney International*, 59(4), 1498–1509. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590041498.x>
- Kampe, K., Sieber, J., Orellana, J. M., Mundel, P., & Jehle, A. W. (2014). Susceptibility of podocytes to palmitic acid is regulated by fatty acid oxidation and inversely depends on acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306(4), 401–409. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00454.2013>
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K. I., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., & Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1494–1505. <https://doi.org/10.1172/JCI26498>
- Kang, H. M., Ahn, S. H., Choi, P., Ko, Y. A., Han, S. H., Chinga, F., Park, A. S. D., Tao, J., Sharma, K., Pullman, J., Bottinger, E. P., Goldberg, I. J., & Susztak, K. (2015). Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nature Medicine*, 21(1), 37–46. <https://doi.org/10.1038/nm.3762>
- Kaplan, B.S., Renaud, L. & Drummond, K. N. (1976). Effects of aminonucleoside, daunomycin, and adriamycin on carbon oxidation by glomeruli. *Lab Invest.*, 34, 174–178.
- Karsdal, M. A., Genovese, F., Madsen, E. A., Manon-Jensen, T., & Schuppan, D. (2016). Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis. *Journal of Hepatology*, 64(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.014>

- Karsdal, M. A., Nielsen, M. J., Sand, J. M., Henriksen, K., Genovese, F., Bay-Jensen, A. C., Smith, V., Adamkewicz, J. I., Christiansen, C., & Leeming, D. J. (2013). Extracellular matrix remodeling: The common denominator in connective tissue diseases possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. In *Assay and Drug Development Technologies* (Köt. 11, Szám 2, o. 70–92). <https://doi.org/10.1089/adt.2012.474>
- Kashtan, C., Fish, A. J., Kleppel, M., Yoshioka, K., & Michael, A. F. (1986). Nephritogenic antigen determinants in epidermal and renal basement membranes of kindreds with Alport-type familial nephritis. *Journal of Clinical Investigation*, 78(4), 1035–1044. <https://doi.org/10.1172/JCI112658>
- Kaucsár, T., Godó, M., Révész, C., Kovács, M., Mócsai, A., Kiss, N., Albert, M., Krenács, T., Szénási, G., & Hamar, P. (2016). Urine/plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin ratio is a sensitive and specific marker of subclinical acute kidney injury in mice. *PLoS ONE*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148043>
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., & Natori, T. (1994). OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 24(SUPPL.), S317–S320. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(94\)90269-0](https://doi.org/10.1016/0168-8227(94)90269-0)
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M., & Natori, T. (1992). Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 41(11), 1422–1428. <https://doi.org/10.2337/diab.41.11.1422>
- Kehlet, S. N., Sanz-Pamplona, R., Brix, S., Leeming, D. J., Karsdal, M. A., & Moreno, V. (2016). Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. *Scientific Reports*, 6(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep30599>
- Kehlet, Stephanie N., Willumsen, N., Armbrrecht, G., Dietzel, R., Brix, S., Henriksen, K., & Karsdal, M. A. (2018). Age-related collagen turnover of the interstitial matrix and basement membrane: Implications of age- and sex-dependent remodeling of the extracellular matrix. *PLoS ONE*, 13(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194458>

- Keith, D. S., Nichols, G. A., Gullion, C. M., Brown, J. B., & Smith, D. H. (2004). Longitudinal Follow-up and Outcomes among a Population with Chronic Kidney Disease in a Large Managed Care Organization. *Archives of Internal Medicine*, *164*(6), 659–663. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.6.659>
- Keşkek, Ş., Kurşun, Ö., Ortoğlu, G., Bankir, M., Tüzün, Z., & Saler, T. (2018). Obesity without comorbidity may also lead to non-thyroidal illness syndrome. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *27*(11), 1515–1520. <https://doi.org/10.17219/acem/70226>
- Kim, D., Lee, J. E., Jung, Y. J., Lee, A. S., Lee, S., Park, S. K., Kim, S. H., Park, B. H., Kim, W., & Kang, K. P. (2013). Metformin decreases high-fat diet-induced renal injury by regulating the expression of adipokines and the renal AMP-activated protein kinase/acetyl-CoA carboxylase pathway in mice. *International Journal of Molecular Medicine*, *32*(6), 1293–1302. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1508>
- Kim, Y. H., Goyal, M., Kurnit, D., Wharram, B., Wiggins, J., Holzman, L., Kershaw, D., & Wiggins, R. (2001). Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney international*, *60*(3), 957–968. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.060003957.x>
- Kirylyuk, K. (2016). Challenges in Rare Variant Association Studies for Complex Kidney Traits: CFHR5 and IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *27*(9), 2547–2551. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016040383>
- Kitamura, Y., Nishikawa, A., Nakamura, H., Furukawa, F., Imazawa, T., Umemura, T., Uchida, K., & Hirose, M. (2005). Effects of N -Acetylcysteine, Quercetin, and Phytic Acid on Spontaneous Hepatic and Renal Lesions in LEC Rats. *Toxicologic Pathology*, *33*(5), 584–592. <https://doi.org/10.1080/01926230500246675>
- Koncsos, G., Varga, Z. V., Baranyai, T., Boengler, K., Rohrbach, S., Li, L., Schlüter, K. D., Schreckenber, R., Radovits, T., Oláh, A., Mátyás, C., Lux, Á., Al-Khrasani, M., Komlódi, T., Bukosza, N., Máthé, D., Deres, L., Barteková, M., Rajtík, T., ... Ferdinandy, P. (2016). Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *311*(4), H927–H943. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00049.2016>
- Kriz, W., Elger, M., Nagata, M., Kretzler, M., Uiker, S., Koeppen-Hageman, I., Tenschert,

- S., & Lemley, K. V. (1994). The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney international. Supplement*, 45, S64-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158902>
- Kriz, Wilhelm, Hähnel, B., Hosser, H., Ostendorf, T., Gaertner, S., Kränzlin, B., Gretz, N., Shimizu, F., & Floege, J. (2003). Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14(7), 1904–1926. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000070073.79690.57>
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., & Noda, T. (2002). Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25863–25866. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200251200>
- Kume, S., Uzu, T., Araki, S. I., Sugimoto, T., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sakaguchi, M., Kubota, N., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Haneda, M., Kashiwagi, A., & Koya, D. (2007). Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(10), 2715–2723. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007010089>
- Kümpers, P., Gueler, F., Rong, S., Mengel, M., Tossidou, I., Peters, I., Haller, H., & Schiffer, M. (2007). Leptin is a coactivator of TGF- $\beta$  in unilateral ureteral obstructive kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(4), F1355–F1362. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00003.2007>
- Lavie, C. J., Milani, R. V., & Ventura, H. O. (2009). Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(21), 1925–1932. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.068>
- Lee, H. S. (2012). Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 129–140. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1169-7>
- Lee, J.-E., Lee, Y. H., Kim, S.-Y., Kim, Y. G., Moon, J.-Y., Jeong, K.-H., Lee, T. W., Ihm, C.-G., Kim, S., Kim, K. H., Kim, D. K., Kim, Y. S., Kim, C.-D., Park, C. W., Lee, D. Y., & Lee, S.-H. (2016). Systematic biomarker discovery and coordinative validation for different primary nephrotic syndromes using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1453, 105–115.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.058>

- LeHir, M., & Kriz, W. (2007). New insights into structural patterns encountered in glomerulosclerosis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 16(3), 184–191. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3280c8eed3>
- Lennon, R., Byron, A., Humphries, J. D., Randles, M. J., Carisey, A., Murphy, S., Knight, D., Brenchley, P. E., Zent, R., & Humphries, M. J. (2014). Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 939–951. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013030233>
- Leung, N., Bridoux, F., Hutchison, C. A., Nasr, S. H., Cockwell, P., Ferman, J.-P., Dispenzieri, A., Song, K. W., Kyle, R. A., & International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. (2012). Monoclonal gammopathy of renal significance: when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood*, 120(22), 4292–4295. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445304>
- Li, Q.-Y., Li, H.-Y., Fu, G., Yu, F., Wu, Y., & Zhao, M.-H. (2017). Autoantibodies against C-Reactive Protein Influence Complement Activation and Clinical Course in Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 28(10), 3044–3054. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016070735>
- Liu, J., Xie, J., Zhang, X., Tong, J., Hao, X., Ren, H., Wang, W., & Chen, N. (2017). Serum C3 and Renal Outcome in Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03344-1>
- Liu, P., Xie, X., & Jin, J. (2020). Isotopic Nitrogen-15 Labeling of Mice Identified Long-lived Proteins of the Renal Basement Membranes. *Scientific Reports*, 10(1), 5317. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62348-6>
- Liu, Q., & Nilsen-Hamilton, M. (1995). Identification of a new acute phase protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(38), 22565–22570. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22565>
- Liu, X., Fan, Q., Yang, G., Liu, N., Chen, D., Jiang, Y., & Wang, L. (2013). Isolating glomeruli from mice: A practical approach for beginners. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5(5), 1322–1326. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1000>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using

- real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopez-Hellin, J., Cantarell, C., Jimeno, L., Sanchez-Fructuoso, A., Puig-Gay, N., Guirado, L., Vilariño, N., Gonzalez-Roncero, F. M., Mazuecos, A., Lauzurica, R., Burgos, D., Plumed, J. S., Jacobs-Cacha, C., Jimenez, C., Fernandez, A., Fernandez-Alvarez, P., Torregrosa, V., Nieto, J. L., Meseguer, A., & Alonso, A. (2013). A form of apolipoprotein A-I is found specifically in relapses of focal segmental glomerulosclerosis following transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13(2), 493–500. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04338.x>
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., & Saltiel, A. R. (2007). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(1), 166–174. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00284.2006>
- Ly, S., Liu, G., Sun, A., Wang, J., Cheng, J., Wang, W., Liu, X., Nie, H., & Guan, G. (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis in vivo and in vitro by inhibiting TGF- $\beta$  signalling via secretion of bone morphogenetic protein 7. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 11(4), 251–261. <https://doi.org/10.1177/1479164114531300>
- Ma, S., Zhu, X.-Y., Eirin, A., Woollard, J. R., Jordan, K. L., Tang, H., Lerman, A., & Lerman, L. O. (2016). Perirenal Fat Promotes Renal Arterial Endothelial Dysfunction in Obese Swine through Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Journal of Urology*, 195(4 Part 1), 1152–1159. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.08.105>
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P. A., & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, 1(11), 1155–1161. <https://doi.org/10.1038/nm1195-1155>
- Martínez-García, C., Izquierdo-Lahuerta, A., Vivas, Y., Velasco, I., Yeo, T. K., Chen, S., & Medina-Gomez, G. (2015). Renal lipotoxicity-associated inflammation and insulin resistance affects actin cytoskeleton organization in podocytes. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142291>
- Matsusaka, T., Sandgren, E., Shintani, A., Kon, V., Pastan, I., Fogo, A. B., & Ichikawa,



- I. (2011). Podocyte injury damages other podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(7), 1275–1285. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010090963>
- Matsusaka, T., Xin, J., Niwa, S., Kobayashi, K., Akatsuka, A., Hashizume, H., Wang, Q. C., Pastan, I., Fogo, A. B., & Ichikawa, I. (2005). Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4), 1013–1023. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004080720>
- McClain, D. A., Hazel, M., Parker, G., & Cooksey, R. C. (2005). Adipocytes with increased hexosamine flux exhibit insulin resistance, increased glucose uptake, and increased synthesis and storage of lipid. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(5), E973–E979. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00549.2004>
- Mena-Sánchez, G., Babio, N., Martínez-González, M., Corella, D., Schröder, H., Vioque, J., Romaguera, D., Martínez, J. A., Lopez-Miranda, J., Estruch, R., Wärnberg, J., Bueno-Cavanillas, A., Serra-Majem, L., Tur, J. A., Arós, F., Tinahones, F. J., Sánchez, V. M., Lapetra, J., Pintó, X., ... Salas-Salvadó, J. (2018). Fermented dairy products, diet quality, and cardio-metabolic profile of a Mediterranean cohort at high cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(10), 1002–1011. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.05.006>
- Menon, V., Li, L., Wang, X., Greene, T., Balakrishnan, V., Madero, M., Pereira, A. A., Beck, G. J., Kusek, J. W., Collins, A. J., Levey, A. S., & Sarnak, M. J. (2006). Adiponectin and Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9), 2599–2606. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006040331>
- Meyer-Schwesinger, C., Lange, C., Bröcker, V., Agustian, P. A., Andina Agustian, P., Lehmann, U., Raabe, A., Brinkmeyer, M., Kobayashi, E., Schiffer, M., Büsche, G., Kreipe, H. H., Thaïss, F., & Becker, J. U. (2011). Bone marrow-derived progenitor cells do not contribute to podocyte turnover in the puromycin aminoglycoside and renal ablation models in rats. *The American journal of pathology*, 178(2), 494–499. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.024>
- Mirioglu, S., Caliskan, Y., Ozluk, Y., Dirim, A. B., Istemihan, Z., Akyildiz, A., Yazici, H., Turkmen, A., Kilicaslan, I., & Sever, M. S. (2019). Co-Deposition of IgM and

- C3 May Indicate Unfavorable Renal Outcomes in Adult Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney and Blood Pressure Research*, 44(5), 961–972. <https://doi.org/10.1159/000501827>
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Bulmer, K., Holly, J. M., Yudkin, J. S., & Coppack, S. W. (1999). Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *The American journal of physiology*, 277(6), E971-5. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.6.E971>
- Morfin, J. A., Fluck, R. J., Weinhandl, E. D., Kansal, S., McCullough, P. A., & Komenda, P. (2016). Intensive Hemodialysis and Treatment Complications and Tolerability. *American Journal of Kidney Diseases*, 68(5), S43–S50. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.05.021>
- Mount, P., Davies, M., Choy, S. W., Cook, N., & Power, D. (2015). Obesity-related chronic kidney disease—The role of lipid metabolism. *Metabolites*, 5(4), 720–732. <https://doi.org/10.3390/metabo5040720>
- Mózes, M. M., Szoleczky, P., Rosivall, L., & Kökény, G. (2017). Sustained hyperosmolarity increases TGF- $\beta$ 1 and Egr-1 expression in the rat renal medulla. *BMC Nephrology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0626-2>
- Mulay, S. R., Thomasova, D., Ryu, M., Kulkarni, O. P., Migliorini, A., Bruns, H., Gröbmayr, R., Lazzeri, E., Lasagni, L., Liapis, H., Romagnani, P., & Anders, H.-J. (2013). Podocyte loss involves MDM2-driven mitotic catastrophe. *The Journal of pathology*, 230(3), 322–335. <https://doi.org/10.1002/path.4193>
- Murugapandian, S., Mansour, I., Hudeeb, M., Hamed, K., Hammode, E., Bijin, B., Daheshpour, S., Thajudeen, B., & Kadambi, P. (2016). Epidemiology of Glomerular Disease in Southern Arizona: Review of 10-Year Renal Biopsy Data. *Medicine*, 95(18), e3633. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003633>
- Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. A., & Hynes, R. O. (2012). The matrisome: In silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(4), 1–18. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>
- Nagai, Y., Yao, L., Kobori, H., Miyata, K., Ozawa, Y., Miyatake, A., Yukimura, T., Shokoji, T., Kimura, S., Kiyomoto, H., Kohno, M., Abe, Y., & Nishiyama, A. (2005). Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the

- development of renal injury in type 2 diabetic rats. *Journal of the American Society of Nephrology*, *16*(3), 703–711. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004080649>
- Narita, I., Kondo, D., Goto, S., Saito, N., Watanabe, Y., Yamazaki, H., Sakatsume, M., Saito, A., & Gejyo, F. (2001). Association of gene polymorphism of polymeric immunoglobulin receptor and IgA nephropathy. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, *40*(9), 867–872. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.40.867>
- Nath, S., Ghosh, S. K., & Choudhury, Y. (2017). A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *84*, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.10.007>
- Nielsen, M. J., Kazankov, K., Leeming, D. J., Karsdal, M. A., Krag, A., Barrera, F., McLeod, D., George, J., & Grønbaek, H. (2015). Markers of collagen remodeling detect clinically significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137302>
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., & Sugiura, S. (2008). In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, *118*(2), 710–721. <https://doi.org/10.1172/JCI33328>
- Nomiyama, K., Nomiyama, H., Kameda, N., Tsuji, A., & Sakurai, H. (1999). Mechanism of hepatorenal syndrome in rats of Long–Evans Cinnamon strain, an animal model of fulminant Wilson’s disease. *Toxicology*, *132*(2–3), 201–214. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00005-0)
- Ohse, T., Chang, A. M., Pippin, J. W., Jarad, G., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., Miner, J. H., & Shankland, S. J. (2009). A new function for parietal epithelial cells: A second glomerular barrier. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *297*(6), 1566–1574. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00214.2009>
- Ohtomo, S., Nangaku, M., Izuhara, Y., Yamada, N., Dan, T., Mori, T., Ito, S., Van Ypersele De Strihou, C., & Miyata, T. (2008). The role of megsin, a serine protease inhibitor, in diabetic mesangial matrix accumulation. *Kidney International*, *74*(6), 768–774. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.302>
- Okamura, T., Pei, X. Y., Miyoshi, I., Shimizu, Y., Takanashi-Yanobu, R., Mototani, Y.,

- Kanai, T., Satoh, J., Kimura, N., & Kasai, N. (2013). Phenotypic characterization of LEA rat: A new rat model of nonobese type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/986462>
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, 18(3), 363–374. <https://doi.org/10.1038/nm.2627>
- Pang, Y., Tan, Y., Li, Y., Zhang, J., Guo, Y., Guo, Z., Zhang, C., Yu, F., & Zhao, M.-H. (2016). Serum A08 C1q antibodies are associated with disease activity and prognosis in Chinese patients with lupus nephritis. *Kidney international*, 90(6), 1357–1367. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.010>
- Park, J., Ahmadi, S.-F., Streja, E., Molnar, M. Z., Flegal, K. M., Gillen, D., Kovesdy, C. P., & Kalantar-Zadeh, K. (2017). Obesity paradox in end-stage kidney disease patients. *Progress in cardiovascular diseases*, 56(4), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2013.10.005>
- Pawar, R. D., Pitashny, M., Gindea, S., Tieng, A. T., Levine, B., Goilav, B., Campbell, S. R., Xia, Y., Qing, X., Thomas, D. B., Herlitz, L., Berger, T., Mak, T. W., & Putterman, C. (2012). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*, 64(5), 1620–1631. <https://doi.org/10.1002/art.33485>
- Pippin, J. W., Sparks, M. A., Glenn, S. T., Buitrago, S., Coffman, T. M., Duffield, J. S., Gross, K. W., & Shankland, S. J. (2013). Cells of renin lineage are progenitors of podocytes and parietal epithelial cells in experimental glomerular disease. *The American journal of pathology*, 183(2), 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.024>
- Puig-Gay, N., Jacobs-Cacha, C., Sellarès, J., Guirado, L., González Roncero, F., Jiménez, C., Zárrega, S., Paul, J., Lauzurica, R., Alonso, Á., Fernández, A., Beneyto, I., Mazuecos, A., Hernández, D., Rodríguez-Benot, A., Franco, A., Jimeno, L., Crespo, M., Meseguer, A., ... Cantarell, C. (2019). Apolipoprotein A-Ib as a biomarker of focal segmental glomerulosclerosis recurrence after kidney transplantation: diagnostic performance and assessment of its prognostic value – a multi-centre cohort study. *Transplant International*, 32(3), 313–322. <https://doi.org/10.1111/tri.13372>

- Randles, M. J., Woolf, A. S., Huang, J. L., Byron, A., Humphries, J. D., Price, K. L., Kolatsi-Joannou, M., Collinson, S., Denny, T., Knight, D., Mironov, A., Starborg, T., Korstanje, R., Humphries, M. J., Long, D. A., & Lennon, R. (2015). Genetic background is a key determinant of glomerular extracellular matrix composition and organization. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(12), 3021–3034. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040419>
- Rhee, C. M., Ahmadi, S. F., & Kalantar-Zadeh, K. (2016). The dual roles of obesity in chronic kidney disease: A review of the current literature. In *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (Köt. 25, Szám 3, o. 208–216). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000212>
- Rinschen, M. M., Gödel, M., Grahammer, F., Zschiedrich, S., Helmstädter, M., Kretz, O., Zarei, M., Braun, D. A., Dittrich, S., Pahmeyer, C., Schroder, P., Teetzen, C., Gee, H., Daouk, G., Pohl, M., Kuhn, E., Schermer, B., Küttner, V., Boerries, M., ... Huber, T. B. (2018). A Multi-layered Quantitative In Vivo Expression Atlas of the Podocyte Unravels Kidney Disease Candidate Genes. *Cell Reports*, *23*(8), 2495–2508. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.059>
- Róka, B., Tod, P., Kaucsár, T., Vizovišek, M., Vidmar, R., Turk, B., Fonović, M., Szénási, G., & Hamar, P. (2020). The acute phase response is a prominent renal proteome change in sepsis in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010200>
- Rood, I. M., Deegens, J. K. J., & Wetzels, J. F. M. (2012). Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: Implications for clinical practice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *27*(3), 882–890. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr771>
- Roos, A., Rastaldi, M. P., Calvaresi, N., Oortwijn, B. D., Schlagwein, N., Van Gijlswijk-Janssen, D. J., Stahl, G. L., Matsushita, M., Fujita, T., Van Kooten, C., & Daha, M. R. (2006). Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *17*(6), 1724–1734. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005090923>
- Rubel, C., Fernández, G. C., Dran, G., Bompadre, M. B., Isturiz, M. A., & Palermo, M. S. (2001). Fibrinogen Promotes Neutrophil Activation and Delays Apoptosis. *The Journal of Immunology*, *166*(3), 2002–2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.2002>

- Ruggenenti, P., Porrini, E. L., Gaspari, F., Motterlini, N., Cannata, A., Carrara, F., Cella, C., Ferrari, S., Stucchi, N., Parvanova, A., Iliev, I., Dodesini, A. R., Trevisan, R., Bossi, A., Zaletel, J., & Remuzzi, G. (2012). Glomerular Hyperfiltration and Renal Disease Progression in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *35*(10), 2061–2068. <https://doi.org/10.2337/dc11-2189>
- Ruggenenti, Piero, Ruggiero, B., Cravedi, P., Vivarelli, M., Massella, L., Marasà, M., Chianca, A., Rubis, N., Ene-Iordache, B., Rudnicki, M., Pollastro, R. M., Capasso, G., Pisani, A., Pennesi, M., Emma, F., & Remuzzi, G. (2014). Rituximab in steroid-dependent or frequently relapsing idiopathic nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, *25*(4), 850–863. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013030251>
- Rutkowski, J. M., Wang, Z. V., Park, A. S. D., Zhang, J., Zhang, D., Hu, M. C., Moe, O. W., Susztak, K., & Scherer, P. E. (2013). Adiponectin Promotes Functional Recovery after Podocyte Ablation. *Journal of the American Society of Nephrology*, *24*(2), 268–282. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012040414>
- Sabater, D., Agnelli, S., Arriarán, S., Fernández-López, J. A., Romero, M. D. M., Alemany, M., & Remesar, X. (2014). Altered nitrogen balance and decreased urea excretion in male rats fed cafeteria diet are related to arginine availability. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/959420>
- Sand, J. M., Larsen, L., Hogaboam, C., Martinez, F., Han, M. L., Larsen, M. R., Nawrocki, A., Zheng, Q., Karsdal, M. A., & Leeming, D. J. (2013). 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*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084934>
- Savary, S., Trompier, D., Andréoletti, P., Le Borgne, F., Demarquoy, J., & Lizard, G. (2012). Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation. *Current drug metabolism*, *13*(10), 1358–1370. <https://doi.org/10.2174/138920012803762729>
- Sayanthooran, S., Magana-Arachchi, D. N., Gunerathne, L., & Abeysekera, T. (2017). Potential diagnostic biomarkers for chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in Sri Lanka: a pilot study. *BMC Nephrology*, *18*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0440-x>
- Schell, C., Rogg, M., Suhm, M., Helmstädter, M., Sellung, D., Yasuda-Yamahara, M.,

- Kretz, O., Küttner, V., Suleiman, H., Kollipara, L., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Eimer, S., Shaw, A. S., Kramer-Zucker, A., Hirano-Kobayashi, M., Abe, T., Aizawa, S., Grahammer, F., ... Huber, T. B. (2017). The FERM protein EPB41L5 regulates actomyosin contractility and focal adhesion formation to maintain the kidney filtration barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(23), E4621–E4630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617004114>
- Schneeman, T. A., Bruno, M. E. C., Schjerven, H., Johansen, F.-E., Chady, L., & Kaetzel, C. S. (2005). Regulation of the Polymeric Ig Receptor by Signaling through TLRs 3 and 4: Linking Innate and Adaptive Immune Responses. *The Journal of Immunology*, *175*(1), 376–384. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.376>
- Schurder, J., Rafat, C., & Vigneron, C. (2017). Complement-dependent, monoclonal gammopathy-associated thrombotic microangiopathy. *Kidney international*, *92*(2), 516. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.04.039>
- Schwartz, G. J., Whitney, A., Skoglund, C., Castonguay, T. W., & Moran, T. H. (1999). Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *277*(4 46-4), 1144–1151. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.4.r1144>
- Seibler, J., Kleinridders, A., Küter-Luks, B., Niehaves, S., Brüning, J. C., & Schwenk, F. (2007). Reversible gene knockdown in mice using a tight, inducible shRNA expression system. *Nucleic Acids Research*, *35*(7). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm122>
- Seiler, M. W., Venkatachalam, M. A., & Cotran, R. S. (1975). Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science (New York, N.Y.)*, *189*(4200), 390–393. <https://doi.org/10.1126/science.1145209>
- Sepandar, F., Rashidbeygi, E., Maghbooli, Z., Khorrami-Nezhad, L., Hajizadehghaz, M., & Mirzaei, K. (2019). The association between resting metabolic rate and metabolic syndrome May Be mediated by adipokines in overweight and obese women. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, *13*(1), 530–534. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.012>
- Sethi, S., Fervenza, F. C., Zhang, Y., & Smith, R. J. H. (2012). Secondary focal and segmental glomerulosclerosis associated with single-nucleotide polymorphisms in

- the genes encoding complement factor H and C3. *American Journal of Kidney Diseases*, 60(2), 316–321. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.04.011>
- Seung, W. L., Kyoung, E. S., Dong, S. S., Sung, M. A., Eun, S. H., Dae, J. K., Moon, S. N., & Lee, K. W. (2005). Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 69(2), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.12.010>
- Shang, W.; Wang, Z. (2017). The Update of NGAL in Acute Kidney Injury. *Curr Protein Pept Sci.*, 18(12), 1211-1217. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160909125004>.
- Shankland, S. J. (2006). The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International*, 69(12), 2131–2147. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000410>
- Sharma, K., RamachandraRao, S., Qiu, G., Usui, H. K., Zhu, Y., Dunn, S. R., Ouedraogo, R., Hough, K., McCue, P., Chan, L., Falkner, B., & Goldstein, B. J. (2008). Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(5), 1645–1656. <https://doi.org/10.1172/JCI32691>
- Shui, H. A., Ka, S. M., Yang, S. M., Lin, Y. F., Lo, Y. F., & Chen, A. (2007). Osteopontin as an injury marker expressing in epithelial hyperplasia lesions helpful in prognosis of focal segmental glomerulosclerosis. *Translational Research*, 150(4), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2007.04.003>
- Sieber, J., Lindenmeyer, M. T., Kampe, K., Campbell, K. N., Cohen, C. D., Hopfer, H., Mundel, P., & Jehle, A. W. (2010). Regulation of podocyte survival and endoplasmic reticulum stress by fatty acids. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 299(4). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00196.2010>
- Smeets, B., Kuppe, C., Sicking, E. M., Fuss, A., Jirak, P., Van Kuppevelt, T. H., Endlich, K., Wetzels, J. F. M., Gröne, H. J., Floege, J., & Moeller, M. J. (2011). Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(7), 1262–1274. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010090970>
- Sörensen, I., Susnik, N., Inhester, T., Degen, J. L., Melk, A., Haller, H., & Schmitt, R. (2011). Fibrinogen, acting as a mitogen for tubulointerstitial fibroblasts, promotes renal fibrosis. *Kidney International*, 80(10), 1035–1044.



<https://doi.org/10.1038/ki.2011.214>

- Strassheim, D., Renner, B., Panzer, S., Fuquay, R., Kulik, L., Ljubanović, D., Holers, V. M., & Thurman, J. M. (2013). IgM contributes to glomerular injury in FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology*, *24*(3), 393–406. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012020187>
- Subramaniam, S., Jurk, K., Hobohm, L., Jackel, S., Saffarzadeh, M., Schwierczek, K., Wenzel, P., Langer, F., Reinhardt, C., & Ruf, W. (2017). Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. In *Blood* (Köt. 129, Szám 16). <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-749879>
- Sumi, E., Iehara, N., Akiyama, H., Matsubara, T., Mima, A., Kanamori, H., Fukatsu, A., Salant, D. J., Kita, T., Arai, H., & Doi, T. (2007). SRY-related HMG box 9 regulates the expression of Col4a2 through transactivating its enhancer element in mesangial cells. *American Journal of Pathology*, *170*(6), 1854–1864. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060899>
- Sun, K., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(6), 2094–2101. <https://doi.org/10.1172/JCI45887>
- Sung, H. K., Chan, Y. K., Han, M., Jahng, J. W. S., Song, E., Danielson, E., Berger, T., Mak, T. W., & Sweeney, G. (2017). Lipocalin-2 (NGAL) Attenuates Autophagy to Exacerbate Cardiac Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(8), 2125–2134. <https://doi.org/10.1002/jcp.25672>
- Svirid, A. V., Ershov, P. V., Yablokov, E. O., Kaluzhskiy, L. A., Mezentsev, Y. V., Florinskaya, A. V., Sushko, T. A., Strushkevich, N. V., Gilep, A. A., Usanov, S. A., Medvedev, A. E., & Ivanov, A. S. (2017). Direct Molecular Fishing of New Protein Partners for Human Thromboxane Synthase. *Acta naturae*, *9*(4), 92–100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340222>
- Swaminathan, S., Leung, N., Lager, D. J., Melton, L. J., Bergstralh, E. J., Rohlinger, A., & Fervenza, F. C. (2006). Changing Incidence of Glomerular Disease in Olmsted County, Minnesota: A 30-Year Renal Biopsy Study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *1*(3), 483–487. <https://doi.org/10.2215/CJN.00710805>

- Szalay, C. I., Erdélyi, K., Kökény, G., Lajtár, E., Godó, M., Révész, C., Kaucsár, T., Kiss, N., Sárközy, M., Csont, T., Krenács, T., Szénási, G., Pacher, P., & Hamar, P. (2015). Oxidative/nitrative stress and inflammation drive progression of doxorubicin-induced renal fibrosis in rats as revealed by comparing a normal and a fibrosis-resistant rat strain. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127090>
- Szeto, H. H., Liu, S., Soong, Y., Alam, N., Prusky, G. T., & Seshan, S. V. (2016a). Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury. *Kidney International*, *90*(5), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.013>
- Szeto, H. H., Liu, S., Soong, Y., Alam, N., Prusky, G. T., & Seshan, S. V. (2016b). Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury. *Kidney International*, *90*(5), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.013>
- Takemoto, M., Asker, N., Gerhardt, H., Lundkvist, A., Johansson, B. R., Saito, Y., & Betsholtz, C. (2002). A New Method for Large Scale Isolation of Kidney Glomeruli from Mice. *The American Journal of Pathology*, *161*(3), 799–805. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64239-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64239-3)
- Tamura, K., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T., & Urushidani, T. (2006). COMPARISON OF GENE EXPRESSION PROFILES AMONG PAPILLA, MEDULLA AND CORTEX IN RAT KIDNEY. In *The Journal of Toxicological Sciences* (Köt. 31, Szám 5).
- Tan, Y., & Zhao, M. H. (2018). Complement in glomerular diseases. *Nephrology*, *23*, 11–15. <https://doi.org/10.1111/nep.13461>
- Tang, F., Hao, Y., Zhang, X., & Qin, J. (2017). Effect of echinacoside on kidney fibrosis by inhibition of TGF- $\beta$ 1/smads signaling pathway in the db/db mice model of diabetic nephropathy. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 2813–2826. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S143805>
- Taniguchi, K., Xia, L., Goldberg, H. J., Lee, K. W. K., Shah, A., Stavar, L., Masson, E. A. Y., Momen, A., Shikatani, E. A., John, R., Husain, M., & Fantus, I. G. (2013). Inhibition of src kinase blocks high glucose-induced EGFR transactivation and collagen synthesis in mesangial cells and prevents diabetic nephropathy in mice. *Diabetes*, *62*(11), 3874–3886. <https://doi.org/10.2337/db12-1010>

- Tateyama, Y., Techasrivichien, T., Musumari, P. M., Suguimoto, S. P., Zulu, R., Macwan'gi, M., Dube, C., Ono-Kihara, M., & Kihara, M. (2018). Obesity matters but is not perceived: A cross-sectional study on cardiovascular disease risk factors among a population-based probability sample in rural Zambia. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208176>
- Thurman, J. M., Wong, M., Renner, B., Frazer-Abel, A., Giclas, P. C., Joy, M. S., Jalal, D., Radeva, M. K., Gassman, J., Gipson, D. S., Kaskel, F., Friedman, A., & Trachtman, H. (2015). Complement activation in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136558>
- Tohma, T., Shimabukuro, M., Oshiro, Y., Yamakawa, M., Shimajiri, Y., & Takasu, N. (2004). Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, reduces microalbuminuria in the insulin-resistant Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *53*(11), 1405–1410. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.06.005>
- Udi, S., Hinden, L., Earley, B., Drori, A., Reuveni, N., Hadar, R., Cinar, R., Nemirovski, A., & Tam, J. (2017). Proximal tubular cannabinoid-1 receptor regulates obesity-induced CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, *28*(12), 3518–3532. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016101085>
- Van Der Heijden, R. A., Bijzet, J., Meijers, W. C., Yakala, G. K., Kleemann, R., Nguyen, T. Q., De Boer, R. A., Schalkwijk, C. G., Hazenberg, B. P. C., Tietge, U. J. F., & Heeringa, P. (2015). Obesity-induced chronic inflammation in high fat diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent renal amyloidosis. *Scientific Reports*, *5*(November), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep16474>
- Venkatachalam, M. A., Cotran, R. S., & Karnovsky, M. J. (1970). An ultrastructural study of glomerular permeability in aminonucleoside nephrosis using catalase as a tracer protein. *Journal of Experimental Medicine*, *132*(6), 1168–1180. <https://doi.org/10.1084/jem.132.6.1168>
- Verani, R. R., & Hawkins, E. P. (1986). Recurrent focal segmental glomerulosclerosis. A pathological study of the early lesion. *American journal of nephrology*, *6*(4), 263–270. <https://doi.org/10.1159/000167173>
- Viau, A., El Karoui, K., Laouari, D., Burtin, M., Nguyen, C., Mori, K., Pillebout, E.,

- Berger, T., Mak, T. W., Knebelmann, B., Friedlander, G., Barasch, J., & Terzi, F. (2010). Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(11), 4065–4076. <https://doi.org/10.1172/JCI42004>
- Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine*, *344*(14), 1058–1066. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>
- Wang, F., Yu, F., Tan, Y., Song, D., & Zhao, M. (2012). Serum complement factor H is associated with clinical and pathological activities of patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, *51*(12), 2269–2277. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes218>
- Wang, H., Zheng, C., Xu, X., Zhao, Y., Lu, Y., & Liu, Z. (2018). Fibrinogen links podocyte injury with Toll-like receptor 4 and is associated with disease activity in FSGS patients. *Nephrology*, *23*(5), 418–429. <https://doi.org/10.1111/nep.13046>
- Wang, W., Guo, X., Wu, H., Wang, N., & Xu, X. (2006). [Effect of fenofibrate and metformin on lipotoxicity in OLETF rat kidney]. *Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences*, *38*(2), 170–175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16617360>
- Wang, Y., Zheng, C., Wang, X., Zuo, K., & Liu, Z. (2017). Proteomic profile-based screening of potential protein biomarkers in the urine of patients with nephrotic syndrome. *Molecular Medicine Reports*, *16*(5), 6276–6284. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7329>
- Wang, Z., Wei, X., Zhang, Y., Ma, X., Li, B., Zhang, S., Du, P., Zhang, X., & Yi, F. (2009). NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *24*(5–6), 619–626. <https://doi.org/10.1159/000257517>
- Wasilewska, A., Taranta-Janusz, K., Kuroczycka-Saniutycz, E., & Zoch-Zwierz, W. (2011). Urinary OPN excretion in children with glomerular proteinuria. *Advances in Medical Sciences*, *56*(2), 193–199. <https://doi.org/10.2478/v10039-011-0034-y>
- Wei, C., El Hindi, S., Li, J., Fornoni, A., Goes, N., Sageshima, J., Maiguel, D., Karumanchi, S. A., Yap, H. K., Saleem, M., Zhang, Q., Nikolic, B., Chaudhuri, A., Daftarian, P., Salido, E., Torres, A., Salifu, M., Sarwal, M. M., Schaefer, F., ...

- Reiser, J. (2011). Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Medicine*, 17(8), 952–960. <https://doi.org/10.1038/nm.2411>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Wharram, B. L., Goyal, M., Wiggins, J. E., Sanden, S. K., Hussain, S., Filipiak, W. E., Saunders, T. L., Dysko, R. C., Kohno, K., Holzman, L. B., & Wiggins, R. C. (2005). Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(10), 2941–2952. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005010055>
- Willumsen, N., Bager, C. L., Leeming, D. J., Smith, V., Christiansen, C., Karsdal, M. A., Dornan, D., & Bay-Jensen, A. C. (2014). Serum biomarkers reflecting specific tumor tissue remodeling processes are valuable diagnostic tools for lung cancer. *Cancer Medicine*, 3(5), 1136–1145. <https://doi.org/10.1002/cam4.303>
- Willumsen, N., Bager, C. L., Leeming, D. J., Smith, V., Karsdal, M. A., Dornan, D., & Bay-Jensen, A. C. (2013). Extracellular matrix specific protein fingerprints measured in serum can separate pancreatic cancer patients from healthy controls. *BMC Cancer*, 13, 2–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-554>
- Winer, S., & Winer, D. A. (2012). The adaptive immune system as a fundamental regulator of adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Immunology and Cell Biology*, 90(8), 755–762. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.110>
- Wolf, G., Chen, S., Han, D. C., & Ziyadeh, F. N. (2002). Leptin and renal disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 39(1), 1–11. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.29865>
- Wolf, G., Hamann, A., Han, D. C., Helmchen, U., Thaiss, F., Ziyadeh, F. N., & Stahl, R. A. (1999). Leptin stimulates proliferation and TGF- $\beta$  expression in renal glomerular endothelial cells: Potential role in glomerulosclerosis. *Kidney International*, 56(3), 860–872. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00626.x>
- Wolf, G., & Ziyadeh, F. N. (2006). Leptin and renal fibrosis. In *Contributions to*

- Nephrology* (Köt. 151, o. 175–183). <https://doi.org/10.1159/000095328>
- Wong, M. G., Panchapakesan, U., Qi, W., Silva, D. G., Chen, X. M., & Pollock, C. A. (2011). Cation-independent mannose 6-phosphate receptor inhibitor (PXs25) inhibits fibrosis in human proximal tubular cells by inhibiting conversion of latent to active TGF- $\beta$ 1. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *301*(1), 84–93. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00287.2010>
- Woo, K. T., Chan, C. M., Lim, C., Choo, J., Chin, Y. M., Teng, E. W. L., Mok, I., Kwek, J. L., Loh, A. H. L., Choong, H. L., Tan, H. K., Lee, G. S. L., Lee, E., Wong, K. S., Tan, P. H., & Foo, M. (2019). A Global Evolutionary Trend of the Frequency of Primary Glomerulonephritis over the Past Four Decades. *Kidney Diseases*, *5*(4), 247–258. <https://doi.org/10.1159/000500142>
- Wu, T. H., Li, K. J., Yu, C. L., & Tsai, C. Y. (2018). Tamm–Horsfall protein is a potent immunomodulatory molecule and a disease biomarker in the urinary system. *Molecules*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010200>
- Wu, Y., Liu, Z., Xiang, Z., Zeng, C., Chen, Z., Ma, X., & Li, L. (2006). Obesity-related glomerulopathy: Insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. *Endocrinology*, *147*(1), 44–50. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0641>
- Xing, G. Q., Chen, M., Liu, G., Heeringa, P., Zhang, J. J., Zheng, X., Jie, E., Kallenberg, C. G. M., & Zhao, M. H. (2009). Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis. *Journal of Clinical Immunology*, *29*(3), 282–291. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9268-2>
- Yagame, M., Kim, Y., Zhu, D., Suzuki, D., Eguchi, K., Nomoto, Y., Sakai, H., Groppoli, T., Steffes, M. W., & Mauer, S. M. (1995). Differential distribution of type IV collagen chains in patients with diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephron*, *70*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1159/000188542>
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., ... Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine*, *7*(8), 941–

946. <https://doi.org/10.1038/90984>
- Yang, J., Zhou, Q., Wang, Y., Liu, K., & Zhang, J. (2009). [Effect of high glucose on PKC and MMPs/TIMPs in human mesangial cells]. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences*, *34*(5), 425–431. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483291>
- Yang, X., Tan, Y., Yu, F., & Zhao, M. (2012). Interference of antimodified C-reactive protein autoantibodies from lupus nephritis in the biofunctions of modified C-reactive protein. *Human immunology*, *73*(2), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.12.007>
- Yoshida, Y., Miyazaki, K., Kamiie, J., Sato, M., Okuizumi, S., Kenmochi, A., Kamijo, K., Nabetani, T., Tsugita, A., Xu, B., Zhang, Y., Yaoita, E., Osawa, T., & Yamamoto, T. (2005). Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database. *Proteomics*, *5*(4), 1083–1096. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401075>
- Zaza, G., Bernich, P., Lupo, A., & „Triveneto” Register of Renal Biopsies (TVRRB). (2013). Renal biopsy in chronic kidney disease: lessons from a large Italian registry. *American journal of nephrology*, *37*(3), 255–263. <https://doi.org/10.1159/000348566>
- Zeisberg, M., Ericksen, M. B., Hamano, Y., Neilson, E. G., Ziyadeh, F., & Kalluri, R. (2002). Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *295*(2), 401–407. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00693-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00693-9)
- Zhai, Y. L., Meng, S. J., Zhu, L., Shi, S. F., Wang, S. X., Liu, L. J., Lv, J. C., Yu, F., Zhao, M. H., & Zhang, H. (2016). Rare variants in the complement factor H-related protein 5 gene contribute to genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, *27*(9), 2894–2905. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010012>
- Zhang, Y. li, Qiao, S. kai, Wang, R. ying, & Guo, X. nan. (2018). NGAL attenuates renal ischemia/reperfusion injury through autophagy activation and apoptosis inhibition in rats. *Chemico-Biological Interactions*, *289*(215), 40–46.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.04.018>

Zhang, Y. M., Gu, Q. H., Huang, J., Qu, Z., Wang, X., Meng, L. Q., Wang, F., Liu, G., Cui, Z., & Zhao, M. H. (2016). Clinical significance of IgM and C3 glomerular deposition in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *11*(9), 1582–1589. <https://doi.org/10.2215/CJN.01190216>

Zhao, Y., Li, G., Wang, Y., & Liu, Z. (2018). Alteration of Connexin43 expression in a rat model of obesity-related glomerulopathy. *Experimental and Molecular Pathology*, *104*(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.11.017>



## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

#### 10.1.1. Első szerzős

Bukosza EN, Kornauth C, Hummel K, Schachner H, Huttary N, Krieger S, Nöbauer K, Oszwald A, Razzazi Fazeli E, Kratochwill K, Aufricht C, Szénási G, Hamar P, Gebeshuber CA (2020). **ECM Characterization Reveals a Massive Activation of Acute Phase Response during FSGS.** *Int J Mol Sci.* 21(6). pii: E2095. doi: 10.3390/ijms21062095.

Bukosza EN, Kaucsár T, Godó M, Lajtár E, Tod P, Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Nguyen MT, Schachner H, Sóti C, Ferdinandy P, Giricz Z, Szénási G, Hamar P. (2019). **Glomerular Collagen Deposition and Lipocalin-2 Expression Are Early Signs of Renal Injury in Prediabetic Obese Rats.** *Int J Mol Sci.* 20(17). pii: E4266. doi: 10.3390/ijms20174266.

### 10.2. A disszertációtól független közlemények:

#### 10.2.1. Megosztott első szerzős

Bukosza EN, Kratochwill K, Kornauth C, Schachner H, Aufricht C, Gebeshuber CA.(2020). **Podocyte RNA sequencing reveals Wnt- and ECM-associated genes as central in FSGS.** *PLoS One.* 15(4):e0231898. doi: 10.1371/journal.pone.0231898. eCollection 2020. PMID: 32302353

Boehm M, Bukosza EN, Huttary N, Herzog R, Aufricht C, Kratochwill K, Gebeshuber CA. (2019). **A systems pharmacology workflow with experimental validation to assess the potential of anakinra for treatment of focal and segmental glomerulosclerosis.** *PLoS One.* 14(3):e0214332. doi: 10.1371/journal.pone.0214332. eCollection 2019. PMID:30921378

#### 10.2.2. Társszerzős közlemények

Nagy CT, Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Tuza S, Kassai F, Ernyey AJ, Gyertyán I, Király K, Oláh A, Radovits T, Merkely B, Bukosza N, Szénási G, Hamar P, Mathé D, Szigeti K, Pelyhe C, Jelemenský M, Onódi Z, Helyes Z, Schulz R, Giricz Z, Ferdinandy

P. (2018). **Selegiline reduces adiposity induced by high-fat, high-sucrose diet in male rats.** *Br J Pharmacol.* 175(18):3713-3726. doi: 10.1111/bph.14437. PMID:29971762

Brown M, Johnson LA, Leone DA, Majek P, Vaahtomeri K, Senfter D, Bukosza N, Schachner H, Asfour G, Langer B, Hauschild R, Parapatics K, Hong YK, Bennett KL, Kain R, Detmar M, Sixt M, Jackson DG, Kerjaschki D.(2018). **Lymphatic exosomes promote dendritic cell migration along guidance cues.** *J Cell Biol.* 217(6):2205-2221. doi: 10.1083/jcb.201612051. PMID:29650776

Wolf D, Bukosza N, Engel D, Poggi M, Jehle F, Anto Michel N, Chen YC, Colberg C, Hoppe N, Dufner B, Boon L, Blankenbach H, Hilgendorf I, von Zur Muhlen C, Reinöhl J, Sommer B, Marchini T, Febbraio MA, Weber C, Bode C, Peter K, Lutgens E, Zirlik A. (2017). **Inflammation, but not recruitment, of adipose tissue macrophages requires signalling through Mac-1 (CD11b/CD18) in diet-induced obesity (DIO).** *Thromb Haemost.* 2017 Jan 26;117(2):325-338. doi: 10.1160/TH16-07-0553. PMID:27853810

Kölling M, Kaucsar T, Schauerte C, Hübner A, Dettling A, Park JK, Busch M, Wulff X, Meier M, Scherf K, Bukosza N, Szénási G, Godó M, Sharma A, Heuser M, Hamar P, Bang C, Haller H, Thum T, Lorenzen JM. (2017). **Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice.** *Mol Ther.* 25(1):165-180. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.08.001. Epub 2017 Jan 4. PMID:28129112

Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Boengler K, Rohrbach S, Li L, Schlüter KD, Schreckenberger R, Radovits T, Oláh A, Mátyás C, Lux Á, Al-Khrasani M, Komlódi T, Bukosza N, Máthé D, Deres L, Barteková M, Rajtík T, Adameová A, Szigeti K, Hamar P, Helyes Z, Tretter L, Pacher P, Merkely B, Giricz Z, Schulz R, Ferdinandy P. (2016). **Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 311(4):H927-H943. doi: 10.1152/ajpheart.00049.2016. PMID:27521417

Willecke F, Tiwari S, Rupprecht B, Wolf D, Hergeth S, Hoppe N, Dufner B, Schulte L, Anto Michel N, Bukosza N, Marchini T, Jäckel M, Stachon P, Hilgendorf I, Zeschky K,

Schleicher R, Langer HF, von Zur Muhlen C, Bode C, Peter K, Zirlik A. (2014). **Interruption of classic CD40L-CD40 signalling but not of the novel CD40L-Mac-1 interaction limits arterial neointima formation in mice.** *Thromb Haemost.* 112(2):379-89. doi: 10.1160/TH13-08-0653. PMID:24652469

Wolf D, Jehle F, Michel NA, Bukosza EN, Rivera J, Chen YC, Hoppe N, Dufner B, Rodriguez AO, Colberg C, Nieto L, Rupprecht B, Wiedemann A, Schulte L, Peikert A, Bassler N, Lozhkin A, Hergeth SP, Stachon P, Hilgendorf I, Willecke F, von Zur Mühlen C, von Elverfeldt D, Binder CJ, Aichele P, Varo N, Febbraio MA, Libby P, Bode C, Peter K, Zirlik A. (2014). **Coinhibitory suppression of T cell activation by CD40 protects against obesity and adipose tissue inflammation in mice.** *Circulation.* 129(23):2414-25. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008055. PMID:24664276

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Hálával tartozom témavezetőimnek Prof. Dr. Hamar Péternek és Dr. Szénási Gábornak a PhD hallgatói tevékenységem során biztosított anyagi és szellemi erőforrásokért, mely nélkül egyik téma kidolgozása és publikálása sem jöhetett volna létre.

Köszönöm Dr.Christoph Gebeshubernek a bécsi kutatás éveinek közös munkáját, mely nem csak a közleményeink sikeréhez segített hozzá, hanem személyes és szakmai fejlődésemhez is hozzájárult.

Köszönöm Édesanyámnak, Dr. Nieszner Évának, a példamutatását, ami a tudományos munka iránti elkötelezettségem megalapozását jelentette, és mindazt a materiális, mentális és lelki támogatást, amely a fokozatszerzésig tartó hosszú, munkás évek mindenkorai nehézségein átsegített. Hasonlóképpen köszönöm és ajánlom dolgozatomat drága Nagyanyámnak.

Köszönöm Václav Hanusnak végtelen türelmét és szellemi támogatását, valamint a dolgozat szerkesztése során nyújtott felbecsülhetetlen technikai segítséget.

Köszönöm Munkatársaimnak és Barátaimnak, mindenek előtt Kaucsár Tamásnak, André Oszwaldnak, Christoph Kornauthnak, Sigurd Kriegernek a kutatásainkhoz személyes jelenléttel nyújtott segítséget, a sok értékes szakmai diskurzust és mindazt a tudást és tapasztalatot, melyet tankönyvekből megszerezni nem lehet, Ők azonban önzetlenül továbbadtak nekem.

Köszönöm Helga Schachnernek, hogy bevezetett és mindvégig támogatott a szövettani vizsgálatok világában.

Hálásan köszönöm F.Tóth Krisztina Erasmus-koordinátornak a bécsi kutatásaim befejezéséhez esszenciális mobilitási források biztosításában nyújtott végtelen segítőkészséget és támogatást.

Köszönöm Prof.Dr.Rosivall Lászlónak és Prof.Dr.Dontscho Kerjaschki Professzor Uraknak, hogy az általuk vezetett nivós intézményeknek munkatársa lehettem.