

A Sigma-1 receptor agonisták protektív hatásainak vizsgálata a vese oxigénhiányos károsodása során

Doktori értekezés

Tóth Ákos Roland

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Hosszú Ádám, PhD., tudományos munkatárs

Hivatalos Bírálók: Dr. Dobi Deján, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Kun Szilárd, PhD., egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szabó László PhD., professzor emeritus

Tagok: Dr. Szabó Tamás PhD., egyetemi docens

Dr. Horváth Orsolya PhD.

Budapest
2026

1. Bevezetés

A végstádiumú vesebetegség a krónikus vesebetegség (CKD) progressziójának végső stádiumát jelenti, mely a népesség több mint 10%-át érinti. Világszerte a morbiditás és mortalitás egyik vezető oka. A kórképhez visszafordíthatatlan mértékű vesefunkció-romlás társul, amelynek kezelése dialízissel vagy vesetranszplantációval lehetséges. A vesepótló kezelések közül a transzplantáció jóval előnyösebb, mivel jobb hosszútávú kimenetelt és jobb életminőséget biztosít. A transzplantációkor fellépő iszkémia/reperfúziós károsodás (IRI), mértéke mind a rövid- mind a hosszútávú kimenetelt jelentősen befolyásolja. A IRI mellett a hideg iszkémia hossza is korrelál a késői graft funkcióval.

Az IRI egy komplex patofiziológiai folyamat, melyben számos kóros mechanizmus vesz részt úgy, mint: neutrofil granulociták aktivációja, reaktív oxigéngyökök felszabadulása, valamint egyéb gyulladáshoz vezető faktorok és citokinek felgyülemelése.

A Sigma-1 receptor (S1R) egy multifunkcionális transzmembrán fehérje. Legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben található meg, de a perifériás szervek is expresszálják úgy, mint a máj, a tüdő, a szív és a vese. Számos

molekuláris folyamatban részt vesz, hatását főként különböző ion-csatornák szabályozásán keresztül fejti ki.

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a S1R agonista fluvoxamin (FLU) kezelés protektív a vese IRI-vel szemben. A renoprotektív hatás az Akt-eNOS jelátviteli útvonal modulációján keresztül valósul meg, amelynek terápiás alkalmazására nemzetközi szabadalommal (PCT/HU2015/00014) rendelkezünk.

2. Célkitűzések

- A FLU renoprotektív hatásának a vizsgálata vesetranszplantációs patkánymodellben
- FLU hatásának a vizsgálata *ex vivo* hideg iszkémiás modellben
- Új S1R agonista (VCC904125) fejlesztése, mely nem jut át a vér-agy gáton
- A VCC904125 renoprotektív hatásának vizsgálata vese IRI egérmódelben
- VCC904125-tel kiegészített prezervációs oldat hatásának a vizsgálata hideg iszkémiás modellben
- Az S1R-mediált hatásmechanizmus igazolása S1R knock-out egerek alkalmazásával
- A S1R aktiváció gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus molekuláris mechanizmusainak feltérképezése

3. Módszerek

3.1. Renális izograft autotranszplantáció patkány modell

Kísérleteink során 8 hetes, 200 ± 15 g súlyú ivarérett hím Wistar patkányokat használtunk. Az altatást követően a jobb vese artériát és vénát kiproparáltuk, majd perfundáltuk és 2 órára az alábbiak egyikét tartalmazó edénybe tároltuk:

- (i) hideg Custodiol perfúziós oldat
- (ii) (ii) $10 \mu\text{M}$ FLU-t tartalmazó hideg Custodiol perfúziós oldat

2 óra elteltével a veséket visszahelyeztük a patkányokba és vég- a- véghez anasztomózt végeztünk a renális artérián, vénán, valamint az ureteren. Az ellenoldali veséket eltávolítottuk. A meleg iszkémiás idő minden esetben 35 perc volt.

3.2. Vese iszkémia/reperfúziós modell

6 hetes hím C57BL/6J és S1R knock out egereket 25 perces unilaterális iszkémiának vetettük alá, kontralaterális nefrektómia mellett. Az iszkémia előtt 30 perccel *i.p.* kezeltük az állatokat: fizioiogiás sóoldattal (IRI), vagy VCC904125-tel (IRI+VCC). Kontrollként áloperált állatok szolgáltak. A vér és veseszövet mintákat 24 órával a reperfúziót követően gyűjtöttük be.

3.3. Hideg iszkémiás modell

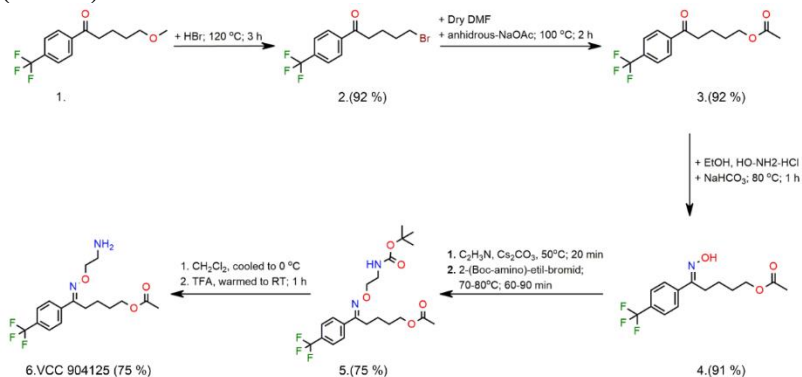
A patkányok és az egerek veséit pefundáltuk Custodiol, vagy S1R agonista tartalmú Custodiol prezervációs oldattal, 80–100 mmHg nyomáson. Ezt követően a veséket ugyanebben az oldatban jégen tartottuk 2 vagy 24 órán keresztül, majd 4%-os puffertolt paraformaldehidben (pH 7,4) fixáltuk további vizsgálatok céljából.

3.4. Vesefunkciós paraméterek mérése

Megmértük a szérum kreatinin, szérum karbamid szérum AST, vesefunkciós paramétereket.

3.5. VCC904125 szintézis

A VCC904125 hatóanyagot 5 kémiai lépésben szintetizáltuk (1.ábra).



1.ábra. A VCC904125 szintézisének útvonala

3.6. *In silico* számítások

A vegyületek háromdimenziós szerkezeteit a LigPrep segítségével, OPLS3e erőter alkalmazásával állítottuk elő. A fiziko-kémiai paramétereket (oktanol–víz megoszlási együttható, a BBB-permeabilitás és a poláris felszín) a QikProp programmal számoltuk.

3.7. Radioligand kötődési assay

10 μM koncentrációban meghatároztuk a VCC904125 kötődését a S1R-hoz valamint hERG-csatornához.

3.8. RP-HPLC mérés

C57BL/6J egereket FLU-val és VCC904125-el kezeltünk. 30 percel később termináltuk, majd agy és vese mintákat gyűjtötünk. Homogenizálást követően RP-HPLC-vel megértük a S1R agonisták mennyiségét.

3.9. *In vitro* modellek

In vitro kísérleteinkben humán proximális tubuláris sejtvonalon (HK-2) 1% O₂, 5% CO₂, and 94% N₂ gázkeverékkel hipoxiát,

lipopoliszachariddal (LPS) gyulladást indukáltunk. A sejteket 10 μ M S1R agonista VCC904125-tel kezeltük.

3.10. Reverz transzkripciós kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

Total RNA isolation Mini Kit segítségével patkány és eger veséből, valamint HK2 sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, majd Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR alkalmazásával komplementer DNS-t szintetizáltunk. A tubuláris károsodás, az apoptózis és a gyulladás folyamataiban szereplő gének relatív expresszióját SYBR Green I Master enzim mix hozzáadásával, RT-qPCR módszerrel mértük. Az eredmények analízise LightCycler 96 v.1.1.0.1320 szoftverrel történt.

3.11. Western blot analízis

Fagyasztott vagy liofilizált mintákból protein lízis puffer segítségével teljes fehérjét izoláltunk. A denaturált fehérjét 4-20% gradient Mini-PROTEAN TGX SDS- poliakrilamid gélen elektroforézis által szétválasztottuk, majd nitrocellulóz membránon rögzítettük. Blokkolást követően a membránokat specifikus antitest oldatokban (cCasp3, Hif1 α , pCAMkII, pNfkb) inkubáltuk egy éjszakán át. Mosást követően a membránokat torna-peroxidázhoz kötött másodlagos antites oldatokban inkubáltuk 1 órán keresztül. A membránokat ismét mostuk, majd a vizsgált fehérjéket Luminata Forte szubsztrát hozzáadásával, Molecular Imager VersaDoc MP 4000 System segítségével detektáltuk. A denzitometriás analízist Quantity One Analysis 4.6.6 szoftverrel

3.12. Szövettan

Formalinban fixált, majd paraffinba ágyazott patkány és eger vese mintából 3 μ m vastag szeleteket metszettünk, majd tárgylemezen rögzítettük. A metszeteket perjódsav-Schiff,

reagenssel festettük. A digitalizálást követően az analízist Panoramic Viewer v.1.15.2 segítségével végeztük.

3.13. Terminális dezoxinukleotidil-transzferáz dUTP nick vég jelölés (TUNEL) esszé

Formalinban fixált, majd paraffinba ágyazott patkány vese mintából 5 µm vastag szeleteket metszettünk, majd Superfrost tárgylemezen rögzítettük. Az apoptotikus sejtek jelölése TUNEL esszé módszerrel, Apoptag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit segítségével történt. A digitalizálást követően az analízist Image J szoftverrel végeztük.

3.14. Immunhisztokémia

Az egér vese mintából 5 µm vastag szeleteket metszettünk, majd tárgylemezen rögzítettük. Ezt követően anti-CD45, anti-CD68, anti-CD4 antitest oldatban inkubáltuk. A jelölés végeztével digitalizáltuk. Az analízist Qpath szoftverrel végeztük.

3.15. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftverrel (10.6.1 verzió) végeztük. A mintaeloszlást Shapiro-Wilk normalitás teszt alapján határoztuk meg. A többszörös összehasonlításokhoz és lehetséges interakciók vizsgálatához egyutas ANOVA és Holm-Sidak post-hoc tesztet használtunk, nem- normál mintaeloszlás esetén pedig Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

4.1. S1R agonista javítja a vesefunkciót és mérsékli a vese strukturális károsodását autotranszplantációt követően

Előzetes eredményeink alapján jelen kísérletünkben megvizsgáltuk a FLU hatását vese autotranszplantációs modellben, 24 órával a transzplantációt követően a FLU javította vesefunkciós paramétereket (szérum karbamid és AST) és csökkentette a korai tubuláris károsodás markerek szintjét (KIM-1 és NGAL).

A FLU-kezelt vesék PAS festett metszetein enyhébb hisztológiai károsodást figyeltünk meg. A glomerulusok intaktak voltak, a tubuláris plazma és sejtmagok normális festődést mutattak, a kefeszegélyek megtartottak voltak.

4.2. A FLU csökkentette a gyulladást transzplantációt követően

A transzplantáció utáni gyulladás hozzájárul a veseallograft károsodásához. S1R aktiváció hatására a FLU-t tartalmazó prezervációs oldatban tárolt vesékben csökkent a leukocytainfiltráció, valamint az MCP-1, IL-1a és IL-6 mRNS-expressziója.

4.3. A S1R agonista FLU mérsékli a vese hideg iszkémiás károsodását

Kísérletünkben már 2 óra hideg tárolás után strukturális károsodást tapasztaltunk. A FLU-t tartalmazó prezervációs oldat lassította a károsodás progresszióját, valamint a FLU-val kezelt vesék károsodása 24 óra hideg iszkémiát követően hasonló volt, mint kezeletlen vesék esetén 2 óra után.

A FLU antiapoptotikus hatását TUNEL és kaszpáz-3 immunfestéssel igazoltuk, mivel mindkét esetben csökkent pozitív sejtszámot tapasztaltunk 2 és 24 óra elteltével is.

4.4. A FLU renoprotektív hatása S1R knock-out egerekben elmarad

Hideg iszkémiás kísérletünket megismételtük S1R knock-out egerekben. Míg FLU kezelés vad típusú egerekben 24 óra hideg ischaemiát követően szignifikánsan mérsékelte a tubuláris strukturális károsodást és az apoptózis mértékét, addig ezek a hatások S1R knock-out egerekben nem voltak megfigyelhetők.

4.5. VCC904125: vér-agy gát penetráció, kötődési affinitás

In silico számításokat végeztünk a VCC904125 farmakokinetikai tulajdonságainak meghatározására. A számítások alapján a VCC904125 minimális vér-agy gát penetrációs képességgel rendelkezik. A radioligand kötődési assay szerint a VCC904125 10 μ M -os koncentrációban hasonló kötődést mutatott a S1R-hoz mint a FLU.

4.6. A S1R agonista VCC904125 nem jut át a vér-agy gáton

RP-HPLC technikával megmértük a VCC904125 és a FLU mennyiségét egér vesében és agyban. A vesében mindkét S1R agonistát kimutattuk, míg az agyban csak a FLU volt jelen. Eredményünk bizonyítja, hogy a VCC904125 nem jut át a vér-agy gáton.

4.7. A VCC904125 csökkentette a tubuláris hipoxiát és az LPS-indukálta gyulladást

HK-2 sejteket előkezeltük S1R agonistával majd hipoxiás környezetbe helyeztük. A VCC904125 csökkentette a fő hipoxiás marker *HIF1A* mRNS szintjét, így mérsékelve a tubuláris hipoxiát. LPS indukálta gyulladásra a *TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *IL1B*, *IL6*, and *TNF* mRNS szintje megemelkedett. Az új S1R agonista VCC904125 csökkentette a gyulladást és a proinflammatorikus citokinek mennyiségét.

4.8. A VCC904125 csökkentette a vese I/R károsodását 24 órával a reperfüziót követően

A S1R protektív szerepének további bizonyítására az egereket VCC904125-tel kezeltük. 24 óra reperfúziót követően a szérumban karbamid kevésbé volt emelkedett a kezelt állatoknál. A korai tubuláris károsodás markerei (KIM-1 és NGAL) mRNS szintjei emelkedtek iszkémiát követően, amit a S1R agonista szignifikánsan csökkentett.

PAS- festett vese metszeteken masszív strukturális károsodást tapasztaltunk (hialin felhalmozódás, vakuolizáció, kefeszegélyvesztés és tubuláris nekrozis). A VCC904125-tel kezelt állatok veséiben kevésbé volt jelen az akut tubuláris nekrozis.

4.9. A VCC904125 renoprotektív hatása S1R knock-out egerekben elmarad

A renoprotektív hatás S1R-mediáltságának bizonyítására a kísérletet S1R knock-out egereken is elvégeztük. Sem funkcionális, sem hisztológiai paramétereken nem tapasztaltunk renoprotektív hatást S1R^{-/-} egerekben.

4.10. A S1R agonista VCC904125 mérsékelte az IRI okozta apoptózist és csökkentette a gyulladást.

A VCC904125 csökkentette az akut és a krónikus hipoxia (*HIF1A* és *HIF2A*) markerei szintjét. Az iszkémiát követően emelkedett *P53* és proapoptotikus *BAX* szintet tapasztaltunk amit a S1R agonista kezelés szignifikánsan csökkentett. Továbbá megemelkedett az apoptózisban kritikus szerepet betöltő kaszpáz-3 fehérje szintje is, ami a VCC904125-tel kezelt csoportban kevésbé volt megfigyelhető.

Végezetül a VCC904125 a kezelés mérsékelte az *IL1β* és a *TNF* génexpresszióját is, a CaMKII–NFκB útvonal modulációján keresztül.

4.11. Nem volt megfigyelhető gyulladásosejtes infiltráció az iszkémiás károsodást követően

24 órával a reperfúziót követően nem volt megfigyelhető CD45⁺ leukocita vagy CD68⁺ makrofág infiltráció egyik vizsgált csoportban sem.

4.12. A VCC904125 csökkentette a tubuláris dillatációt a hideg iszkémiát követően

A hideg iszkémiás modellben vizsgáltuk, hogy a tárolás során, a transzplantációt megelőzően csökkenthető-e a szervkárosodás. Eredményeink szerint a S1R agonista kezelés jelentősen mérsékelte a vese strukturális károsodását.

5. Következtetések

- A S1R-agonista FLU javítja a transzplantációs kimenetelt patkány autotranszplantációs modellben a tubuláris károsodás, a gyulladás és az apoptózis csökkentésével
- *Ex vivo* hideg iszkémia során alkalmazott FLU javította a transzplantáció előtti graft állapotot, így növelhető a szervek maximális tárolási ideje és a beültetésre alkalmas szervek száma
- Az új S1R agonista VCC904125 nem jut át a vér-agy gáton
- Az új S1R-agonista VCC904125 csökkenti a vese iszkémia/reperfúziós károsodását az apoptózis és a gyulladás gátlásán keresztül
- A VCC904125-t tartalmazó prezervációs oldat renoprotektív hatású *ex vivo* hideg ischaemia során
- A FLU és a VCC904125 renoprotektív hatása S1R mediált, melyet S1R knock-out egereken igazoltuk

6. Saját publikációk jegyzéke

A doktori értekezéshez kapcsolódó publikációk

Akos R. Toth, Tamas Lakat, Andras Budai, Hanga Kallay, Balint Szokol, Laszlo J. Wagner, Laszlo Orfi, Marcell Kreko, Attila J. Szabo, Andrea Fekete & Adam Hosszu; Novel Sigma-1 receptor agonist alleviates renal ischemic injury by targeting apoptotic and inflammatory pathways, *Scientific Reports* 2025, **IF= 3.9**

Adam Hosszu, **Akos R Toth**, Tamas Lakat, Ganna Stepanova, Zsuzsanna Antal, Laszlo J Wagner, Attila J Szabo, Andrea Fekete; The Sigma-1 Receptor Is a Novel Target for Improving Cold Preservation in Rodent Kidney Transplants, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, **IF=4.9**

Egyéb publikációk

Tamas Lakat, Andrea Fekete, Kornel Demeter, **Akos R Toth**, Zoltan K Varga, Attila Patonai, Hanga Kelemen, Andras Budai, Miklos Szabo, Attila J Szabo, Kai Kaila, Adam Denes, Eva Mikics, Adam Hosszu; Perinatal asphyxia leads to acute kidney damage and increased renal susceptibility in adulthood, *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2024, **IF=3.4**

Dora B Balogh, Agnes Molnar, Arianna Degi, **Akos Toth**, Lilla Lenart, Adar Saeed, Adrienn Barczi, Attila J Szabo, Laszlo J Wagner, Gyorgy Reusz, Andrea Fekete; Cardioprotective and antifibrotic effects of low-dose renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors in type 1 diabetic rat model, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, **IF=4.9**

IE Vlad, C Martin, **AR Toth**, J Papp, SD Anghel; Bacterial inhibition effect of plasma activated water, Romanian Reports in Physics 2019; **IF=2.147**

Σ IF: 19,247