

**A losartan és mirabegron kezelés hatásának összehasonlítása urémiás  
kardiomiopátia patkány modelljében**

A Ph.D. disszertáció tézisei

**Dr. Kovács Zsuzsanna**

Témavezető: Dr. Márta Sárközy Ph.D.



Biokémiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

**Szegedi Tudományegyetem**

Szeged

**2021**

**Publikált közlemények listája:*****A disszertáció alapjául szolgáló közlemény:***

**I. Kovács ZZA**, Szűcs G, Freiwan M, Kovács MG, Márványkövi FM, Dinh H, Siska A, Farkas K, Kovács F, Kriston A, Horváth P, Kővári B, Cserni BG, Cserni G, Földesi I, Csont T, Sárközy M. Comparison of the antiremodeling effects of losartan and mirabegron in a rat model of uremic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2021 Sep 1;11(1):17495 (**IF: 4,379, D1**)

***További közlemények a Ph.D. képzés ideje alatt:***

**II.** Sárközy M, Márványkövi FM, Szűcs G, **Kovács ZZA**, Szabó MR, Gáspár R, Siska A, Kővári B, Cserni G, Földesi I, Csont T. Ischemic preconditioning protects the heart against ischemia-reperfusion injury in chronic kidney disease in both males and females. *Biol Sex Differ*. 2021 Sep 6;12(1):49. (**IF: 5,027, D1**)

**III.** Sárközy M, Varga Z, Gáspár R, Szűcs G, Kovács MG, **Kovács ZZA**, Dux L, Kahán Z, Csont T. Pathomechanisms and therapeutic opportunities in radiation-induced heart disease: from bench to bedside. *Clin Res Cardiol*. 2021 Apr;110(4):507-531. (**IF: 5,460, D1**)

**IV.** Sárközy M, **Kovács ZZA**, Kovács MG, Gáspár R, Szűcs G, Dux L. Mechanisms and Modulation of Oxidative/Nitrative Stress in Type 4 Cardio-Renal Syndrome and Renal Sarcopenia. *Front Physiol*. 2018 Nov 26;9:1648. (**IF: 3,201, Q2**)

***A Ph.D. képzés ideje alatti további közlemények kumulatív impakt faktora: 13,688***

**A publikációk kumulatív impakt faktora: 18,067**

## **1. Bevezetés**

Krónikus veseelégtelenségnek (KVE) nevezünk minden olyan legalább 3 hónapon át fennálló megbetegedést, amely a vese morfológiai és/vagy funkcionális károsodását okozza és az egyén egészségi állapotára is hatással van. A KVE klinikai tünetegyüttese növekvő népegészségügyi terhet jelent világszerte, mivel valamely stádiuma tíz emberből egyet érint. Ennek oka, hogy a KVE kialakulásának hátterében leggyakrabban a népbetegségnek számító diabétesz mellitusz vagy a magasvérnyomás betegség, illetve az öregedés állnak. KVE esetén mindkét vese glomeruláris, tubuláris és endokrin működése folyamatosan, tartósan romlik, majd irreverzibilisen megszűnik. A kialakuló végstádiumú veseelégtelenségben a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) értéke  $15 \text{ ml/perc}/1,73 \text{ m}^2$  alá csökken és a túléléshez a betegek élethosszig tartó vesepótló kezelésre szorulnak. A nefronok folyamatos pusztulása és a nélkülözhetetlen vesefunkciók elégtelensége számos szövődmény kialakulásához vezet, a felhalmozódó toxikus metabolitok, a víz-, elektrolit-, sav-bázis egyensúly, lipid anyagcsere és a vérnyomás szabályozásának felborulása, illetve a vese hormontermelésének beszűkülése hozzájárulnak a tünetek megjelenéséhez. Legfontosabb kiemelni, hogy a KVE-ben szenvedők esetén a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának rizikója szignifikánsan emelkedett, akár ötször-tízszer nagyobb lehet, mint nem vesebeteg kortársaik esetén. Továbbá a krónikus veseelégtelen betegek leggyakrabban valamely szív-érrendszeri szövődmény következtében halnak meg. A KVE fennállását önálló rizikófaktornak tekintik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulása szempontjából, mivel fontos szerepet játszik a bal kamrai hipertrófia létrejöttében és súlyosbítja az ateroszklerózist is. Összefoglalóan urémiás kardiomiopátiának nevezzük a KVE hatására kialakuló strukturális, funkcionális és elektrofiziológiai elváltozások („remodeling”) összességét a szívben. A 4-es típusú kardiorenális szindróma esetén az elsődlegesen fennálló KVE vezet idővel a kardiovaszkuláris károsodás és szövődmények megjelenéséhez. A veseműködés romlásával a miokardium jellegzetes elváltozásai jellemezzék meg, kezdetben a kompenzált szívelégtelenség képét látjuk (*heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF): bal kamrai hipertófia, fibrózis, diasztolés diszfunkció (DD) jön létre, endotheliális diszfunkció és a kapilláris hálózat gyérülése figyelhető meg. Leírták már állatmodellekben és veseelégtelen betegekben is, hogy KVE-ben a bal kamrai hipertrófia számottevő volumen és/vagy nyomásterhelés megléte nélkül is kialakul, továbbá vesetranszplantáció után a bal kamrai hipertrófia regresszióját láthatjuk. Így valószínűsíthető, hogy a bal kamrai remodeling hátterében további, KVE-ben jellegzetesen aktiválódó egyedi mechanizmusok is állhatnak. A bal kamrai hipertrófia gyakorisága szignifikánsan emelkedik a KVE előrehaladtával: krónikus vesebetegek esetén 50-70%,

illetve a dialízisre kerülő végstádiumú vesebetegek esetén akár 90% is lehet a gyakorisága. Később a kamrafalak fokozódó fibrotikus átépülésével és a kamratüregek kitágulásával párhuzamosan csökkent ejekciós frakcióval járó pangásos szívelégtelenség (*heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF) jelentkezik a KVE progressziója során.

A KVE talaján kialakult urémiás kardiomiopátia megelőzésére, illetve kezelésére mindeddig nem sikerült kifejleszteni hatásos, célzott gyógyszereket. A terápiás lehetőségek közé tartozik a KVE, ill. kardiovaszkuláris megbetegedések rizikófaktorainak (pl. magasvérnyomás betegség, diabétesz mellitusz vagy hiperlipidémia) kezelésére alkalmazott gyógyszerek alkalmazása és a progressziójuk mérséklése, vagy a tüneti terápia más szívelégtelenség kezelésekor használatos hatóanyagokkal. Az urémiás kardiomiopátia kialakulásában számos ok szerepet játszhat, azonban a pontos molekuláris mechanizmusok még nem teljesen feltérképezettek. Feltételezik a szisztémás hatások (a volumen és nyomásterhelés hatására túlaktiválódó renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) és szimpatikus idegrendszer, magas vérnyomás, gyulladás, endotheliális diszfunkció vagy fokozott nitro-oxidatív stressz) mellett KVE-specifikus folyamatok, így például a renális anémia vagy a keringő urémiás toxinok szerepét is az urémiás kardiomiopátia létrejöttében. Urémiás kardiomiopátiában az angiotenzin-II szint túlzott emelkedése és az 1-es típusú angiotenzin-II receptor (AT1)-receptorok aktiválódása elősegítheti a szöveti gyulladást, a nitrogén monoxid (NO) csökkent biológiai hozzáférhetőségét, illetve a nitro-oxidatív stressz növekedését, amelyek a vese és a szív fibrózisának kialakulásához vezethetnek. Így a RAAS rendszer túlaktiválódásának gátlószerei közül az angiotenzin-II receptor blokkolók (ARB) széles körben használt gyógyszerek a KVE és a szívelégtelenség progressziójának a megelőzésére a klinikai gyakorlatban. Az ARB család jól ismert képviselője a losartan, melyet széles körben alkalmaznak az antihipertenzív terápia során. A losartan hipertóniás végstádiumú vesebetegekben képes volt a kardiális hipertrófia és fibrózis kialakulásának mérséklésére is. Annak ellenére, hogy a szívelégtelenség farmakológia kezelésére számos hatóanyag (pl. ARB) áll rendelkezésünkre, a krónikus veseelégtelen betegek kardiovaszkuláris megbetegedése és halálózása továbbra is emelkedett. Az urémiás kardiomiopátia kialakulásának feltérképezése és pontos molekuláris mechanizmusok felderítése új irányvonalakat nyithat meg a célzott farmakológiai terápiában, amely elengedhetetlen a mortalitás csökkentése érdekében.

A HFpEF kezelésében ígéretes új irányvonalnak számít a NO termelés modulálása. A mirabegron újabban a hiperaktív hólyag szindróma kezelésében alkalmazott béta-3

adrenoceptor ( $\beta$ 3-AR) agonista az urológiai gyakorlatban, mivel a detrusor izomzat relaxálása révén fokozza a húgyhólyag kapacitását. A  $\beta$ 3-AR kifejeződését leírták a szívben is, a pitvari és kamrai kardiomiociták és legfőképp a kis koronáriák endotélsejtjeinek felszínén. A  $\beta$ 1- és  $\beta$ 2-adrenoreceptorokkal ellentétben a  $\beta$ 3-AR expressziója fokozódik krónikus iszkémia, illetve szívelégtelenség fennállásakor a krónikus adrenerg túlaktiválódás megelőzése érdekében. Különböző kórállapotok preklinikai modelljében leírták, hogy aktiválódásuk szerepet játszik a kardiomiocita hipertrófia és kardiális fibrózis kialakulása elleni védelemben, illetve javítja a szívizom kontraktilitását az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS)/cGMP jelút aktiválása és  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz mediálta  $\text{Na}^+$  export révén. A  $\beta$ 3-AR által közvetített antioxidáns hatások szerepet játszhatnak az oxidatív stressz és proinflammatorikus hatások okozta károsodások kivédésében. Humán  $\beta$ 3-AR-t expresszáló egerekben leírták, hogy az angiotenzin-II kezelés nem okozott szívizom hipertrófiát vagy fibrózist. Továbbá az apoE knock out egerek hasnyálmirigy és tüdő szövetében a krónikus  $\beta$ 3-AR agonista BRL37344 kezelés hatására csökkent az AT1 receptorok expressziója. Így tehát elmondható, hogy a krónikus  $\beta$ 3-AR aktivációnak szerepe lehet az angiotenzin-II receptorok expressziójának szabályozásában és ezáltal védő hatásai léphetnek fel a hasnyálmirigy, tüdő vagy egyéb szövetekben, mint a szívben. Alapozva a  $\beta$ 3-AR agonisták fent említett kardioprotektív hatásaira, humán klinikai vizsgálatokban tesztelik a mirabegron hatását a bal kamrai hipertrófia, HFpEF és HF<sub>r</sub>EF kialakulására. Mivel ezen klinikai vizsgálatokból a beszűkült vesefunkcióval rendelkező betegeket kizárják, a mirabegron hatásait még nem vizsgálták enyhe vagy mérsékelt súlyos veseelégtelen betegcsoportok esetén, illetve urémiás kardiomiopátia kísérletes modelljében. Így kutatócsoportunk célja volt a mirabegron hatásait vizsgálni urémiás kardiomiopátia patkány modelljében.

## **2. Célkitűzések**

A disszertáció célkitűzése az angiotenzin-II receptor blokkoló losartan és a béta-3 adrenoceptor agonista mirabegron hatásainak összehasonlító vizsgálata a szérum és vizelet paraméterek, a szív morfológiai és funkcionális, illetve a különféle bal kamrai mRNS és fehérjeexpressziós változásaiban, urémiás kardiomiopátia patkány modelljében.

## **3. Anyagok és módszerek**

A kísérlet megfelel a laboratóriumi állatok tartására és felhasználásra vonatkozó nemzetközi irányelveknek (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996), amelyeket a Szegedi Tudományegyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága is jóváhagyott. Kísérleteink végzéséhez

az etikai engedélyt (száma: XV./799/2019) a Csongrád megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága adta ki.

**3.1. 5/6-od nefrektómia:** Kísérleteinkhez összesen 45 felnőtt, hím Wistar patkányt (*Rattus norvegicus*, 280-340 g) használtunk. A KVE-t 5/6-od nefrektómiával hoztunk létre két ülésben pentobarbitálos altatást követően. Az első műtét alkalmával a bal vese alsó és felső pólusát, majd egy hét múlva a teljes jobb vesét eltávolítottuk. A kontroll csoport áloperáción esett át, amelynek során a csak a vesetokok kerültek eltávolításra. Mindkét operációt követően a hasi sebet povidon-jód oldattal fertőtlenítettük, illetve az állatok posztoperatív fájdalomcsillapításban és antibiotikum kezelésben részesítettük további 4 napig.

**3.2. Az állatok követése és gyógyszeres kezelése:** A műtéteket követő 5. héttől a következő kísérleti csoportokat alakítottuk ki: 1) vivőanyaggal kezelt áloperált (*per os* csapvíz, 2 ml/kg/nap,  $n=10$ ), 2) vivőanyaggal kezelt KVE (*per os* csapvíz, 2 ml/kg/nap,  $n=13$ ), 3) losartannal kezelt KVE (*per os* 10 mg/kg/nap csapvízben oldva, 2 ml/kg végtérfogatban,  $n=12$ ) és 4) mirabegronnal kezelt KVE (*per os* 10 mg/kg/nap csapvízben oldva, 2 ml/kg végtérfogatban,  $n=10$ ) csoport. A követési idő vége előtt összesen 6 patkány halálozott el a nefrektomizált csoportokból (2 állat a vivőanyaggal kezelt KVE, 1 állat a losartannal kezelt KVE és 3 állat a mirabegronnal kezelt KVE csoportból).

**3.3. Transztorakális echokardiográfia:** A KVE 4. és 12. hetében a szív funkciójának és morfológiájának megítélésére transztorakális echokardiográfiás felvételeket készítettünk 2%-os izoflurános altatást követően. A Vivid IQ készülékkel és 5.0–11 MHz frekvenciájú vizsgálófejjel 2-dimenziós, M-módú, Doppler, szöveti Doppler és négyüregi felvételeket készítettünk. Az adatok elemzése három egymást követő szívciklust értékelve az egyes csoportok ismerete nélkül, vakon történt.

**3.4. Szérum és vizelet paraméterek meghatározása:** A követési időszak 4. héten a *v. saphena*-ból és a 13. héten az abdominális aortából vért vettünk a szérum paraméterek laboratóriumi vizsgálatához. Vizeletgyűjtés céljából az állatokat 24 óráig metabolikus ketrecbe helyeztük a 4. és 12. héten. A szérum karbamid és kreatinin szinteket UV kinetikus módszerrel határoztuk meg. A szérum nátrium, kálium és kloridionok koncentrációját indirekt potenciometria segítségével mértük, ionszelektív elektródokat használva. Komplexképződésen alapuló mérésekkel határoztuk meg a kalcium, magnézium és foszfát ionok koncentrációját. A vizelet kreatinin és fehérje szintjét standard laboratóriumi módszerekkel határoztuk meg. A szérum összkoleszterin, HDL-koleszterin és triglicerid

szintjét enzimatikus, kolorimetriás mérésekkel vizsgáltuk, míg az LDL-koleszterin szintjét a Friedewald képlet alapján számoltuk ki. Hematológiai analizátor segítségével határoztuk meg a teljes vérkép paramétereit.

**3.5. Vérnyomásmérés:** Az állatok egy-egy alcsoportjában a 13. héten invazív vérnyomásmérés történt pentobarbitálos altatásban, egy PE50 polietilén nyomásmérő katéter *a. femoralis*-ba vezetésével.

**3.6. Terminálás és a szervek eltávolítása:** A 13. héten pentobarbitálos altatást követően az állatok szívét izoláltuk, majd a bal és jobb kamrát különválasztva a szíveket azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben a molekuláris biológiai mérésekhez, továbbá a bal kamrák egy részét 4%-os formalinban fixáltuk a szövettani metszetek elkészítéséhez.

**3.7. Szövettani metszetek:** A bal kamrai hipertrófia kialakulásának igazolására a hematoxilin-eozinnal (HE) festett metszeteken a miokardiális rostátmérőket és a kardiomiociták keresztmetszeti területét vizsgáltuk. Ehhez a Single-Cell Technologies Ltd. Biology Image Analysis Software (BIAS) nevű programját használtuk. A picrosirius vörössel és fast greenel (PSFG) festett szövettani metszeteken fibrózis súlyosságának megítéléséhez egy saját fejlesztésű programot biztosított számunkra kooperációs partnerünk az SZTE SZAOK Patológiai Intézetéből.

**3.8. qRT-PCR mérések:** A bal kamrai frissen fagyasztott mintákból RNS izolálást követően válogatott gének bal kamrai mRNS expresszióját qRT-PCR technika segítségével vizsgáltuk. A válogatott gének a következők voltak: a  $\beta$ 3-adrenoceptor (*Adrb3*), a RAAS-rendszerrel kapcsolatosan az angiotenzinogén (*Agt*) és az 1-es típusú angiotenzin II receptor (*Agtr1a*), a bal kamrai hipertrófiával kapcsolatosan miozin nehéz lánc  $\alpha$  és  $\beta$  izoformák (*Myh6* és *Myh7*), a szöveti gyulladással és fibrózissal kapcsolatosan interleukin-1, interleukin-6 és tumor nekrozis faktor-alfa (*IL1*, *IL6*, és *Tnf- $\alpha$* ), I-es típusú kollagén alfa-1 lánc és kötőszöveti növekedési faktor (*Colla1* és *Ctgf*), szívelégtelenséggel kapcsolatosan A- és B-típusú natriuretikus peptidek (*Nppa* és *Nppb*), és a nitro-oxidatív stresszel kapcsolatosan indukálható nitrogén monoxid szintáz, illetve NADPH oxidáz 4 (*Nos2*, ill. *Nox4*). Eredményeink normalizálásakor a peptidil-prolil izomeráz A (*Ppia*) háztartási gént használtuk kontrollként.

**3.9. Western blot:** a bal kamrai  $\beta$ 3-AR, eNOS, foszfo-eNOS, illetve a diasztolés funkcióval kapcsolatos foszfolambán (PLN), foszfo-PLN, és szarkoplazmás retikulum kalcium-ATPáz 2a (SERCA2a) fehérjék bal kamrai expresszióját határoztuk meg Western blot technika segítségével, aktin ( $\beta$ 3-AR esetén),  $\alpha$ -tubulin (eNOS, foszfo-eNOS és SERCA2a esetén) vagy

GAPDH (PLN és foszfo-PLN esetén) háztartási fehérjék kontrollként való alkalmazásával. A bal kamrai minták homogenizálása után meghatároztuk azok fehérje koncentrációját és a fehérjéket nátrium-dodeciszulfát poliakrilamid gél elektroforézis segítségével választottuk el. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd blokkolást követően elsődleges antitestben inkubáltuk 16 órán át. A másodlagos antitestekkel való inkubálás után a fluorescens jelet Odyssey CLx rendszer segítségével detektáltuk.

**3.10. Statisztikai értékelés:** Eredményeinket 5%-os szignifikancia szinten értékeltük. A kezelési csoportokat egyutas varianciaanalízis (ANOVA) segítségével hasonlítottuk össze, míg a különböző követési időpontokban mért adatok közötti különbségeket az egyes csoportokban ismételt méréses kétutas varianciaanalízissel (*repeated measures* ANOVA) vizsgáltuk.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Az urémiás kardiomiopátia kifejlődésének echokardiográfias, szövettani és molekuláris jelei**

Az 5/6-od nefrektómián átesett állatokban urémiás kardiomiopátia alakult ki, hasonló laboratóriumi és kardiális elváltozásokkal, mint a KVE talaján kialakult HFpEF-ben szenvedő betegekben. Laboratóriumi és echokardiográfias eredményeink összhangban vannak az szakirodalomban leírtakkal és kutatócsoportunk korábbi eredményeivel. Laboratóriumi eredményeink igazolják, hogy 4 héttel a műtétek után, még a gyógyszeres kezelések megkezdése előtt, az 5/6-od nefrektómián átesett csoportokban azonos súlyosságú KVE alakult ki. Elmondhatjuk, hogy a műtétet követő 13. hétre a KVE-re jellemző laboratóriumi változások jelentkeztek, a szérum kreatinin és karbamid szintje, illetve a vizelet fehérje tartalma szignifikánsan megemelkedett, míg a kreatinin clearance értéke szignifikáns csökkent az áloperált csoporthoz képest. Továbbá renális anémia, hiperkalcémia és hiperkoleszterinémia alakult ki az 5/6-od nefrektómián átesett csoportban. Echokardiográfias vizsgálataink urémiás kardiomiopátia kialakulását mutatták, bal kamrai hipertrófia és DD megjelenésével. Továbbá szövettani eredményeink megerősítették a bal kamrai metszeteken a hipertrófia fennállását és a fibrózis jelenlétét. Mindezen eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy KVE modellünkben a humán G2 és G3a stádiumnak megfelelő enyhe vagy mérsékelt súlyos veseelégtelenség áll fenn. Az általunk használt 5/6-od nefrektómia modellben nem jellemző a magas vérnyomás megjelenése. Jelen kísérleteink során csak enyhe vérnyomás emelkedést tapasztaltunk a KVE csoportokban, így modellünkben a vérnyomás emelkedése nem játszhatott szignifikáns szerepet a DD kialakításában. Számos preklinikai és klinikai



tanulmány is leírta különböző szisztémás és KVE-specifikus folyamatok szerepét az urémiás kardiomiopátia létrejöttében, így fontos lehet a volumen és nyomásterhelés hatására túlaktiválódó RAAS és szimpatikus idegrendszer, magas vérnyomás, fokozott szisztémás és szöveti gyulladás, endotheliális diszfunkció, fokozott nitro-oxidatív stressz, csökkent NO szint mellett a renális anémia vagy a keringő urémiás toxinok szerepe is. Modellünkben szisztémás és szöveti gyulladás jelenlétét jelzi a szignifikánsan megemelkedett a fehérvérsejtszám, illetve a *IL1*, *IL6* és *Tnf- $\alpha$*  proinflammatorikus citokinek emelkedett bal kamrai expressziója. KVE-ben a gyulladás és a fokozott nitro-oxidatív stressz kölcsönhatása lényeges lehet a bal kamrai hipertrófia kialakulásában és a HFpEF progressziójában, valamint a NADPH oxidázok (NOX) által termelt szuperoxid-anionok is részt vehetnek az urémiás kardiomiopátia létrejöttében. KVE-modellünkben a *Nox4* bal kamrai expressziója tendenciózus emelkedést mutatott az áloperált csoporthoz képest. A csökkent NO szint háttérében a fokozott szuperoxid-anion termelés miatti peroxinitrit képződés állhat, amely hozzájárulhat a kardiomiociták rugalmatlanságának és a fibrózis kialakulásához. Így DD és endotheliális diszfunkció jelenhet meg HFpEF-ben vagy urémiás kardiomiopátiában. KVE modellünkben a miokardium eNOS expressziója lecsökkent, feltehetően a hipertrófia és a kapilláris hálózat ritkulása miatt, és az eNOS foszforilációja fokozódott a fő aktivációs helyén (Ser1177), amely kompenzációs mechanizmusként szolgálhat a NO termelés növelése érdekében. Így a foszfo-eNOS/eNOS arány tendenciózusan emelkedett KVE-ben. Ezen eredményeink megegyeznek a szakirodalmi adatokkal urémiás kardiomiopátiában. Továbbá fontos megemlíteni, hogy az eNOS szétkapcsolódása esetén NO termelés helyett reaktív oxigén, illetve nitrogén intermedierek képződnek, és a fokozott nitro-oxidatív stressz hozzájárul a bal kamra hipertrófiájához. Állatmodellekben és humán kísérletekben is leírták, hogy az iNOS (*Nos2*) fokozott expressziója a NO termelés zavarát és peroxinitrit képződését okozhatja fokozott oxidatív és proinflammatorikus állapotokban, amely a bal kamra átépülésének kedvez. A *Nos2* expressziója szignifikánsan megemelkedett urémiás kardiomiopátiában. Ezzel szemben az eNOS által termelt NO a PLN fehérje szabályozásán keresztül a SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét és így a bal kamra relaxációját segítheti elő. A SERCA2a expressziójának csökkenése és a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis zavara a relaxáció és a szisztolés funkció romlásához vezethet a szívelégtelenség későbbi szakaszában. Ezzel szemben leírták, hogy az aortabillentyű szűkülete miatt kialakuló korai HFpEF-ben jelentkező DD esetén a SERCA2a és PLN expressziója nem változott. Más tanulmányok viszont leírták, hogy 5/6-od nefrektómia után 8 héttel a PLN foszforilációjának csökkenése a SERCA aktivitás csökkenéséhez vezethetett, míg 24 héttel a műtétek után a PLN foszforilációja

megemelkedett, így nem elhanyagolható a PLN foszforiláció és SERCA aktivitás változása az idő előrehaladásának függvényében. Urémiás kardiomiopátia modellünkben a PLN és SERCA2a expressziója nem változott szignifikánsan 13 héttel a műtétet követően, illetve a losartan vagy mirabegron kezelés hatására, így ezen fehérjék feltételezhetően nem játszottak kulcsszerepet a diasztolés diszfunkció kialakulásában.

#### **4.2. Az ARB losartan terápia hatása az urémiás kardiomiopátiára**

Az urémiás kardiomiopátia esetén a rendelkezésre álló terápiás lehetőségek a társbetegségek és a szívelégtelenség progressziójának megelőzését teszik lehetővé és nem oki terápia révén javítják az urémiás kardiomiopátia kimenetelét. A RAAS gátló ARB-ket rendszeresen alkalmazzák a gyakorlatban a proteinuria, a KVE progressziójának és a kardiovaszkuláris megbetegedések rizikójának mérséklésére krónikus vesebeteggekben. Ismert, hogy a losartan kezelés képes mérsékelni a bal kamrai hipertrófiát és fibrózist, illetve javítani a szív funkcióját 5/6-od nefrektómiát követően és krónikus végstádiumú vesebeteggekben. Jelen kísérleteinkben a losartan kezelés nem volt képes mérsékelni a vesefunkció fő laboratóriumi paramétereinek változását, így a kreatinin clearance csökkenését, a szérum karbamid és kreatinin szintek emelkedését KVE modellünkben. Viszont a losartan szignifikánsan csökkentette a vizelet mennyiségét és a remnant vese súlyát, így enyhe renoprotektív hatásokat mutatott KVE modellünkben. Bizonyított, hogy a RAAS és szimpatikus idegrendszer krónikus túlaktiválódása szívelégtelenségben fokozott gyulladáshoz és nitro-oxidatív stresszhez vezet, amelyek egymást is erősítik. Az angiotenzin-II AT1 receptora révén aktiválhatja a NADPH-oxidázt a szívben és reaktív oxigén, ill. nitrogén szabadgyökök túltermelését okozhatja. A kialakult nitro-oxidatív stressz proinflammatorikus citokinek [IL1, IL6, TNF- $\alpha$ , és transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ )] termelődéséhez vezet és csökkentheti az eNOS expresszióját és NO termelését, így hozzájárulva a szív remodeling folyamatához szívelégtelenségben. Ezek alapján az AT1 receptor gátlása losartan kezeléssel logikus terápiás lehetőséget kínál a nitro-oxidatív stressz, proinflammatorikus folyamatok gátlására és a NO biológiai elérhetőségének a javítására urémiás kardiomiopátiában. Eredményeink alapján a losartan kezelés szignifikánsan mérsékelte az urémiás kardiomiopátiában kialakuló bal kamrai hipertrófiát, fibrózist és diasztolés diszfunkciót. Ezen hatásainak hátterében az AT1 receptoron keresztül közvetített kardiális, ill. szisztémás gyulladást (*IL1*, *IL6*, és *Tnf- $\alpha$* ) és nitro-oxidatív stresszt (*Nox4* és *Nos2*) mérséklő hatása, valamint eNOS-függő mechanizmusok állhatnak KVE-ben. Megjegyzendő, hogy az ARB-k családjába tartozó valsartan kezelés neprilizinnel kombinálva (LCZ696) csökkentette a

kardiális hipertrófiát, ill. fibrózist 5/6-od nefrektómián átesett patkányokban és jelenleg humán klinikai fázis I vizsgálatokban (azonosítószámok: NCT03771729 és NCT04218435) tesztelik a neprilizin/lozartan (LCZ696) hatásait előrehaladott KVE-ben kialakult szívelégtelenségben (NYHA II-IV. stádium). Összefoglalva, eredményeink alapján a losartan képes lehet az urémiás kardiomiopátia mérséklésére és kialakulásának megelőzésére, mindenekelőtt, ha a KVE korai stádiumában, enyhe bal kamrai hipertrófia fennállásakor kezdjük meg a gyógyszeres terápiát.

#### **4.3. A $\beta$ 3-AR agonista mirabegron kezelés hatásai urémiás kardiomiopátiában**

A NO termelés modulálását ígéretes új irányvonalnak tekintik a HFpEF kezelésében. A  $\beta$ 3-AR aktiválódása eNOS által termelt NO révén szerepet játszik a kardiomiocita hipertrófia és kardiális fibrózis mérséklésében, illetve javítja a szívizom kontraktilitását az eNOS/cGMP jelút, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz aktiválása és antioxidáns hatások révén. Jelenleg humán klinikai fázis II és III vizsgálatokban elemzik a mirabegron hatásait a bal kamrai hipertrófia, illetve HFpEF (NYHA I-II. stádium) (Beta3\_LVH klinikai vizsgálat azonosítója: NCT02599480) és HFrEF (NYHA III-IV. stádium) (BEAT HF II klinikai vizsgálat azonosítója: NCT03926754) kialakulására. Fontos megjegyezni, hogy a vesefunkció gyakran csökkent a HFpEF és HFrEF betegekben, mivel a szív vagy a vese megbetegedése a másik szerv károsodását okozza komplex hemodinamikai, neurohormonális és biokémiai kapcsolatok révén kialakítva az ún. kardiorenális szindróma egyes fajtáit. Azonban számos kardiovaszkuláris klinikai vizsgálatból, így a Beta3\_LVH és BEAT HF II vizsgálatokból is kizárják azokat a betegeket, akiknél a vesefunkció enyhe vagy mérsékelten súlyos károsodása ( $\text{eGFR} < 30 \text{ ml/perc}/1,73\text{m}^2$ , azaz G3b-G5 stádium) áll fenn. Így a legjobb tudásunk szerint nem vizsgálták még a mirabegron hatását enyhe vagy mérsékelten súlyos veseelégtelen betegcsoportok esetén. Így jelen kísérletünkben a mirabegron hatását vizsgáltuk urémiás kardiomiopátia patkány modelljében. Eredményeink alapján a mirabegron kezelés nem volt képes mérsékelni a vesefunkció fő laboratóriumi paramétereinek változását, így a kreatinin clearance csökkenését, a szérum karbamid és kreatinin szintek emelkedését KVE modellünkben. Azonban a vesefunkcióra gyakorolt kedvezőtlen hatásait tapasztaltuk, súlyosbodott a renális anémia, a proteinuria és emelkedett a szérum koleszterinszint KVE-ben. A mirabegron kezelés nem csökkentette a fehérvérsejtszámot, de szignifikánsan mérsékelte a bal kamra *IL6* expresszióját, ezáltal a szöveti gyulladást KVE-ben. A mirabegron kezelés nem javított a bal kamrai hipertrófia súlyosságán urémiás kardiomiopátiában echokardiográfiás és szövettani eredményeink alapján. Feltételezzük, hogy ennek hátterében az urémiás kardiomiopátiában

hiányzó  $\beta$ 3-AR overexpresszió és eNOS aktiválta protektív hatások húzódnak. Annak ellenére, hogy a bal kamrai  $\beta$ 3-AR mRNA expresszió szintje emelkedett volt a KVE csoportban az áloperálthoz képest kétmintás t-próbát használva az összehasonlításra, a Western blot vizsgálatok nem mutattak különbséget a bal kamrai  $\beta$ 3-AR fehérje szintek között a KVE 13. hetében. Magyarázatot adhat erre i) a fehérjék fokozott degradációja és körforgása a KVE katabolikus állapotában, és ii) a  $\beta$ 3-AR expresszióváltozása feltehetőleg időbeli eltéréseket mutat urémiás kardiomiopátiában. Kísérleteink során meghatároztuk a  $\beta$ 3-AR expresszióját egy korábbi időpontban is modellünkben, az 5/6-od nefrektómiát követő 9. héten, amikor már kialakult az urémiás kardiomiopátia. A  $\beta$ 3-AR mRNA expressziója a 9. héten szignifikánsan emelkedett volt a KVE-csoportban, azonban a  $\beta$ 3-AR fehérje szintje nem különbözött szignifikánsan az áloperált csoporthoz képest, hasonlóan 13. heti eredményeinkhez. Azonban továbbra sem zárhatjuk ki, hogy a  $\beta$ 3-AR expressziója változik az urémiás kardiomiopátia későbbi szakaszában. Ismert, hogy aortaszűkítéssel létrehozott kísérletes szívelégtelenségben a  $\beta$ 3-AR mRNA és fehérjék miokardiális expressziója pozitív korrelációt mutat a szívelégtelenség súlyosságával és a patkányok életkorának emelkedésével. Továbbá, a  $\beta$ 3-AR pontos szerepe és a részletes hatásmechanizmusai a szívelégtelenség kialakulásában még nem feltérképezettek a különböző társbetegségek esetén. A legtöbb tanulmány a  $\beta$ 3-AR agonista gyógyszerek hatásának vizsgálatok szívelégtelenségben a  $\beta$ 3-AR kapcsolt eNOS/cGMP jelút fő szerepét írta le a bal kamrai hipertrófia, fibrózis mérséklésének és a szívizom kontraktilitás javításának hátterében. Így jelen kísérleteinkben mi is meghatároztuk a bal kamrai eNOS, foszfo-eNOS expresszióját és hányadosuk változását. A mirabegron kezelés hatására nem változott az eNOS, de szignifikánsan lecsökkent a foszfo-eNOS fehérje szintje KVE-ben. Így arra következtethetünk, hogy a  $\beta$ 3-AR és eNOS szétkapcsolódása állhat fenn KVE-ben, fokozott nitro-oxidatív stressz, gyulladásos mechanizmusok és urémiás toxinok kiváltotta hatások következtében. Ugyanakkor, eredményeink alapján a mirabegron mérsékelte a diasztolés diszfunkciót, valamint enyhe fibrózist mérséklő hatást mutatott a szövettani eredmények és a csökkent *Coll1a1* expressziók alapján. Ezen hatásai urémiás kardiomiopátiában valószínűsíthetően a  $\beta$ 3-AR-hoz kapcsolt eNOS aktiválódástól függetlenek és az AT1 receptorok expressziójának csökkentésével magyarázhatóak. ApoE knock out egerek hasnyálmirigy és tüdő szövetében a krónikus  $\beta$ 3-AR agonista BRL37344 kezelés hatására csökkent az AT1 receptorok expressziója és humán  $\beta$ 3-AR-t expresszáló egerekben leírták, hogy az angiotenzin-II kezelés nem okozott szívizom hipertrófiát vagy fibrózist. Publikálták még továbbá, hogy egerekben angiotenzin-II kiváltotta szívelégtelenségben alkalmazott krónikus  $\beta$ 3-AR terápia mérsékelte

a kardiális fibrózist és a DD-t a vérnyomás értékétől függetlenül. Tehát összefoglalva elmondható, hogy a  $\beta$ 3-AR aktiváció szabályozhatja az angiotenzin-II receptorok expresszióját és ezáltal védő szerepe lehet különböző szövetekben. Kísérleteinkben a mirabegron kezelés szignifikánsan csökkentette a *Nox4* és *Nos2* oxidatív stresszmarkerek, illetve az *IL6* gyulladási marker bal kamrai expresszióját KVE-ben. Emellett ezen eredményeinket alátámasztja, hogy a bal kamrai AT1 receptor expressziója szignifikánsan lecsökkent a mirabegron hatására urémiás kardiomiopátiában, így magyarázható a mirabegron kezelés antioxidáns, anti-inflammatórikus és antifibrotikus hatása is. A  $\beta$ 3-AR-ok antioxidáns hatását vizsgálták már makrofágokban, ahol a  $\beta$ 3-AR aktiváció i) direkt NADPH-oxidáz gátlás révén csökkentette a reaktív oxigén intermedierek képződését, és ii) indukálta a kataláz expresszióját, melynek jelentős szerepe van a felszabaduló hidrogén-peroxid eliminálásában. Illetve megerősítették, hogy a  $\beta$ 3-AR stimuláció gátolta több citokin, mint például a TNF- $\alpha$  és IL6, képződését és ezáltal megelőzte a myometrium sejtjeinek apoptózist és az extracelluláris mátrix remodeling folyamatát. Mindezen antioxidatív és anti-inflammatórikus hatásmechanizmusok megismerése hasznos lehet a szívelégtelenség kialakulásának a folyamatában is.

Jelen eredményeink a mirabegron eNOS aktiválódástól független hatására vonatkozóan a kardiális remodeling folyamatában hasznosnak bizonyulhatnak a klinikai gyakorlatban is. A mirabegron kezelés protektív hatásait alkalmazhatjuk az urémiás kardiomiopátia kezdeti szakaszában a KVE talaján kialakuló szívelégtelenség progressziójának mérséklése érdekében. Azonban a vesefunkcióra gyakorolt kedvezőtlen hatásai és szérumszintet növelő hatása miatt a mirabegront a jövőben kombinációs terápia részeként (pl. ARB-kal vagy koleszterincsökkentő sztatinnal) lenne célszerű alkalmazni a kardiális remodeling terápiájában. Emellett megfontolandó lenne a KVE-ben szenvedő betegek szélesebb körű bevonása a klinikai tanulmányokba, amely elősegíthetné új terápiás irányok azonosítását és ezáltal a KVE kardiovaszkuláris mortalitásának csökkentését.

## **5. Következtetések**

Jelen disszertáció célja volt az angiotenzin-II receptor blokkoló losartan és a béta-3 adrenoceptor agonista mirabegron hatásának vizsgálata, illetve összehasonlítása urémiás kardiomiopátia patkány modelljében. Munkánk során a következő megállapításokat tettük:

1. A losartan nem javította szignifikánsan a vesefunkció fő laboratóriumi paramétereit, így csak enyhe renoprotektív hatását figyelhettük meg KVE modellünkben.

2. Ezzel szemben a mirabegron kedvezőtlen hatással volt az anémia, proteinuria és a szérum koleszterinszintre KVE-ben.
3. A losartan mérsékelni tudta az urémiás kardiomiopátiában kialakuló bal kamrai hipertrófiát, míg a mirabegron nem.
4. A losartan és a mirabegron is mérsékelte a kardiális fibrózist és a disztolés diszfunkciót.
5. A losartan kamrai átépülést gátló hatásainak hátterében az AT1 receptoron keresztül közvetített szöveti gyulladást és nitro-oxidatív stresszt mérséklő hatása, illetve eNOS-függő mechanizmusok állhatnak urémiás kardiomiopátiában.
6. A mirabegron antifibrotikus és szöveti gyulladásgátló hatásai urémiás kardiomiopátiában valószínűsíthetően a  $\beta$ 3-AR-hoz kapcsolt eNOS aktiválódástól függetlenek és az AT1 receptorok expressziójának csökkentésével magyarázhatóak.
7. A losartan képes lehet az urémiás kardiomiopátia mérséklésére vagy kialakulásának megelőzésére, mindenekelőtt, ha a KVE korai stádiumában kezdjük a gyógyszeres terápiát.
8. A mirabegron kedvező hatásait kombinációs terápia részeként lenne célszerű alkalmazni a kardiális átépülés terápiajában urémiás kardiomiopátiában.

## **6. Támogatók**

Kutatócsoportunk jelen munkáját és a publikáció megjelenését a GINOP-2.3.2-15-2016 00040, az NKFIH FK129094 (Sárközy Márta részére), az NKFIH K115990 (Csont Tamás részére), az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER) projektek, az Emberi Erőforrások Minisztériuma (20391-3/2018/FEKUSTRAT) és a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (Sárközy Márta részére) támogatta. Továbbá, Sárközy Márta és Kovács Zsuzsanna az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-5-SZTE-166, ÚNKP-19-4-SZTE-89, ÚNKP-19-3-SZTE-160 és ÚNKP-21-3-SZTE-98 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásában részesült. Kovács Zsuzsanna az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 projekt támogatásában részesült.

## **7. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném kifejezni hálámat azoknak, akik a tudományos munkám során támogattak és hozzájárultak a kutatási eredményekhez.

Köszönöm Prof. Dr. Dux Lászlónak az SZTE SZAOK Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének és a SZTE SZAOK Biokémiai Intézet korábbi vezetőjének, illetve

Dr. Csont Tamásnak az SZTE SZAOK Biokémiai Intézet vezetőjének, akik lehetővé tették számomra, hogy az intézetükben folytassam tudományos munkámat az elmúlt években.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sárközy Mártának, aki segítségével és lelkesedésével végigkísért a Ph.D. disszertáció elkészüléséig.

Köszönettel tartozom kooperációs partnereinknek, Dr. Földesi Imrének, Dr. Siska Andreának és Farkas Katalinnak az SZTE SZAOK Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársainak, Prof. Dr. Cserni Gábornak, Cserni Bálint Gábornak, Dr. Kővári Bencének és Daru Krisztiánnak az SZTE SZAOK Pathológiai Intézet munkatársainak, valamint Dr. Horváth Péternek, Kovács Ferencnek és Kriston Andrásnak a Single-Cell Technologies Ltd. munkatársainak.

Hálás vagyok Dr. Szűcs Gergőnek, Marah Freiwan-nak, Hoa Dinh-nak, Ungi Ilonának, Dr. Márványkövi Fanninak, Dr. Dajka Dalmának, Kupecz Klaudiának, Losonczy Rékának és Kiss Mersének, hogy önzetlen segítségükkel hozzájárultak munkámhoz.

Köszönöm „intézeti ikertestvéremnek” Dr. Kovács Móninak, hogy mindig ott volt velem (vagy helyettem) az elmúlt években.

Köszönettel tartozom mindenkinek a laborban, a tudományos támogatásukért és állandó kedvességükért.

És végül külön köszönet szerető családomnak és páromnak, akik nélkül mindez nem jöhetett volna létre.

### **Rövidítések jegyzéke:**

***Adrb3***: béta-3 adrenoceptor (gén)

***Agt***: angiotenzinogén

***Agtr1a***: 1-es típusú angiotenzin II receptor (gén)

***ARB***: angiotenzin-II receptor blokkoló

***AT1***: 1-es típusú angiotenzin II receptor (fehérje)

***β3-AR***: béta-3 adrenoceptor (fehérje)

***KVE***: krónikus veseelégtelenség

***Colla1***: I-es típusú kollagén alfa-1 lánc

***Ctgf***: kötőszöveti növekedési faktor

***DD***: diasztolés diszfunkció

***eNOS***: endotheliális nitrogén monoxid szintáz

***GFR***: glomeruláris filtrációs ráta

***HE***: hematoxilin-eozin

***HFpEF***: megtartott ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség

***HFrEF***: csökkent ejekciós frakcióval járó pangásos szívelégtelenség

***IL1***: interleukin-1

***IL6***: interleukin-6

***Myh6***: miozin nehéz lánc, α izoforma

***Myh7***: miozin nehéz lánc, β izoforma

***NO***: nitrogén monoxid

***Nos2***: indukálható nitrogén monoxid szintáz

***NOX***: NADPH oxidáz

***Nox4***: NADPH oxidáz 4

***Nppa***: A-típusú natriuretikus peptid

***Nppb***: B-típusú natriuretikus peptid

***NYHA***: New York Heart Association

***PLN***: foszfolambán

***Ppia***: peptidil-prolil izomeráz A

***PSFG***: picosirius vörös és fast green

***RAAS***: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

***SERCA***: szarkoplazmás retikulum kalcium-ATPáz

***TGF-β***: transzformáló növekedési faktor béta

***Tnf-α***: tumor nekrozis faktor alfa