

**AZ URÉMIAÁS KARDIOMIOPÁTIA ÉS A SZÍV ISZKÉMIÁS  
PREKONDÍCIONÁLHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS  
VESEELÉGTELENSÉGESEN PATKÁNY MODELLBEN**

A PhD disszertáció rövid összefoglalása

**Dr. Márványkövi Fanni Magdolna**

Témavezető: Dr. Sárközy Márta PhD



Biokémiai Intézet  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
**Szegedi Tudományegyetem**

Szeged

**2023**

**Publikált közlemények listája:*****A PhD disszertáció alapjául szolgáló közlemények (IF: 12.809)***

I. Márta Sárközy\*, **Fanni Magdolna Márványkövi\***, Gergő Szűcs, Zsuzsanna Z.A. Kovács, Márton Richárd Szabó, Renáta Gáspár, Andrea Siska, Imre Földesi, Tamás Csont. *Ischemic preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in chronic kidney disease in both males and females. BIOLOGY OF SEX DIFFERENCES, 2021* Sep 6;12(1):49. DOI: 10.1186/s13293-021-00392-1 (\*Márta Sárközy and Fanni Márványkövi equally contributed to this work). **IF: 8.811, D1.**

II. Márta Sárközy, Renáta Gáspár, Ágnes Zvara, Andrea Siska, Bence Kővári, Gergő Szűcs, **Fanni Márványkövi**, Mónika Gabriella Kovács, Petra Diószegi, László Bodai, Nóra Zsindely, Márton Pipicz, Kamilla Gömöri, Krisztina Kiss, Péter Bencsik, Gábor Cserni, László G. Puskás, Imre Földesi, Thomas Thum, Sándor Bátkai, Tamás Csont. *Chronic kidney disease induces left ventricular overexpression of the pro-hypertrophic microRNA-212. SCIENTIFIC REPORTS, 2019* Feb 4;9(1):1302. DOI: 10.1038/s41598-018-37690-5. **IF: 3.998, D1.**

***További közlemények a PhD képzés ideje alatt***

III. Zsuzsanna Kovács, Gergő Szűcs, Marah Freiwan, Mónika Gabriella Kovács, **Fanni M Márványkövi**, Hoa Dinh, Andrea Siska, Katalin Farkas, Ferenc Kovács, András Kriston, Péter Horváth, Bence Kővári, Bálint Gábor Cserni, Gábor Cserni, Imre Földesi, Tamás Csont, Márta Sárközy. *Comparison of the antiremodeling effects of losartan and mirabegron in a rat model of uremic cardiomyopathy. SCIENTIFIC REPORTS, 2021* Sep 1;11(1):17495. DOI: 10.1038/s41598-021-96815-5. **IF: 4.379, D1.**

***A PhD képzés ideje alatti további közlemények kumulatív impakt faktora: 4.379***

**A publikációk kumulatív impakt faktora: 17.188**

## 1. Bevezetés

A krónikus veseelégtelenség (KVE) előfordulása világszerte gyors ütemben növekszik, amely jelentős mértékben hozzájárul a morbiditáshoz és a mortalitáshoz. KVE-ről beszélünk akkor, ha a betegeknél legalább 3 hónapja fennáll rendellenes vese struktúra és/vagy funkció (glomeruláris filtrációs ráta [GFR]  $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ). A KVE prevalenciája világszerte 7-12% között mozog, és folyamatosan növekszik a leggyakoribb elsődleges okok, köztük a magas vérnyomás és a cukorbetegség növekvő előfordulása miatt. A korai KVE-stádiumok (G1-G3,  $\text{GFR} > 30 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ) életkor szerinti globális prevalenciája magasabb a nőknél, mint a férfiaknál. Fontos megjegyezni, hogy a nők körében nemcsak a csökkent GFR-rel járó KVE-stádiumok, hanem a normál GFR-rel járó albuminuria esetén is magasabb KVE prevalenciát találtak. A halálozás a férfiak körében magasabb, a predialízis előtti KVE minden stádiumában, míg a dialízis kezelésben részesülő betegek halálozása hasonló a férfiak és a nők esetében.

A KVE jelenléte a kardiovaszkuláris szövődmények független kockázati tényezője. A KVE-ben és a végstádiumú veseelégtelenségben (ESRD) szenvedő betegeknél 5-10-szer nagyobb a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázata, mint a hasonló életkorú kontroll populációban. Nagy populációs vizsgálatok arról számoltak be, hogy a KVE minden stádiuma hajlamosít a korai halálra, főként a szív- és érrendszeri betegségek (CVD) miatt, és ez nem korlátozódik az ESRD-re. Érdekes módon a kardiovaszkuláris halálozás előfordulása sokkal magasabb a G2 és G3 stádiumú KVE betegeknél, mint az ESRD betegeknél. Továbbá, a szív- és érrendszeri események gyakrabban halálos kimenetelűek a KVE betegeknél, mint a nem vesebeteg egyéneknél.

Az urémiás kardiomiopátiát (azaz a 4-es típusú kardiorenális szindrómát) a szív strukturális, funkcionális és elektrofiziológiai átalakulásaként határozzák meg KVE-ben. Az urémiás kardiomiopátiát a bal kamrai hipertrófia (LVH) és fibrózis, diasztolés és szisztolés diszfunkció, endotél diszfunkció és a további szív- és érrendszeri megbetegedésekre - beleértve az akut szívinfarktust (AMI) és a ritmuszavarokat - való fokozott hajlam jellemzi. Epidemiológiai és képalkotó vizsgálatok bizonyították, hogy az urémiás kardiomiopátia elsődleges manifesztációja az LVH, előfordulása a KVE progressziójával nő (G3 stádium: 31%, G4: 50%, G5 és ESRD: 90%). Az urémiás kardiomiopátia kezdeti stádiumát a LVH mellett diasztolés diszfunkció jellemzi, majd később súlyos kardiális fibrózis és szisztolés diszfunkció jelenik meg szívelégtelenséghez vezetve. A makrovaszkuláris károsodás feltételezhetően fontosabb a KVE korai szakaszában, a mikrovaszkuláris károsodás pedig inkább a KVE késői szakaszában játszhat jelentősebb szerepet. Ezért az AMI inkább a KVE korai stádiumaiban gyakori

halálozási ok. Ezzel szemben az a KVE késői stádiumaiban ill. ESRD-ben a betegek hajlamosabbak a hirtelen szívhalálra az LVH és szívelégtelenség, az előrehaladott atheroszklerózis és az elektrolitzavarokkal összefüggő ritmuszavarok miatt.

Preklinikai és klinikai vizsgálatok egyaránt bizonyították, hogy a KVE-vel kapcsolatos tényezők (beleértve az urémiás toxinokat és a renális anémiát) a KVE és a CVD-k közös kockázati tényezőin túl (mint például a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer [RAAS] és a szimpatikus idegrendszer túlzott aktiválásával járó nyomás- és térfogattúlterhelés, magas vérnyomás, endothelkárosodás, gyulladás és fokozott nitro-oxidatív stressz) elsősegítik az LVH kialakulását. Az urémiás kardiomiopátia kialakulásának pontos molekuláris mechanizmusai azonban még mindig nem tisztázottak. Az LVH súlyossága és fennállása erősen összefügg a kardiovaszkuláris eseményekkel és a halálozási kockázattal KVE és ESRD betegeknél. Annak ellenére, hogy az alapbetegségek - beleértve a magas vérnyomást, a cukorbetegséget és a hiperlipidémiát - kezelésére széles körben rendelkezésre állnak a standard gyógyszerek, a KVE betegek körében a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás még mindig magas. Ezért az urémiás kardiomiopátia és az LVH kialakulásában szerepet játszó specifikus, mechanizmusok felderítésére van szükség, hogy új terápiás célpontokat lehessen azonosítani az urémiás kardiomiopátia kezelésében.

Az endogén mikroRNS-ek (miR) rövid (kb. 22 bp), nem kódoló RNS-ek, poszttranszkripció szabályozók, amelyek specifikus mRNS-eket céloznak, és komplementer kötődésen keresztül a fehérjeszintézist gátolják vagy az mRNS degradáció fokozódását eredményezik, így befolyásolva a sejtműködést. A specifikus miR-ek diszregulációját számos kardiovaszkuláris betegségben kulcsfontosságú kóroki tényezőként tartják számon. A miR-212/132 klasztert a nyomástúlterhelés okozta LVH és szívelégtelenség kialakulásának központi szabályozójaként azonosították, mely az antihipertrófiás transzkripció faktor *forkhead boxprotein O3* (FOXO3) represszióján keresztül fejt ki hatását. Továbbá a miR-132-től függetlenül a miR-212 fokozott kifejeződéséről azt találták, hogy az LVH és a szívelégtelenség kialakulásában játszik szerepet, a magzati génexpressziós program újbóli aktiválásán keresztül emberi szívben. Továbbá a miR-212 hipertrófiás potenciálját primer újszülött patkány kardiomiocitákban is megerősítették. A FOXO3-on túlmenően a miR-212 egyéb LVH-val kapcsolatos, prediktált ill. validált célpontjait is azonosították. Ezek közé tartozik például az extracelluláris jel által szabályozott 2-es kináz (ERK2) és az adenzin-monofoszfát (AMP) által aktivált fehérje kináz (AMPK). Eddig nem állt rendelkezésre irodalmi adat a miR-212 és a szív hipertrófiával és fibrózissal kapcsolatos célpontjainak kardiális expressziójáról urémiás kardiomiopátiában.

A szív egyik legerősebb endogén adaptív mechanizmusa az iszkémiás prekondicionálás (IPRE), amelynek során rövid iszkémiás és reperfúziós (I/R) periódusokat alkalmazva jelentősen fokozható a szív ellenállóképessége egy későbbi hosszabb iszkémiás sérüléssel (pl. AMI) szemben. Az IPRE klinikai megfelelőjének tekintik az infarktus előtti anginát, a bemelegedési jelenséget („*warm-up phenomenon*”) és a transzluminális koszorúér-angioplasztikát. Bár az IPRE figyelemre méltó kardioprotekciót biztosít számos fajban, beleértve az embert is, munkacsoportunk és mások preklinikai és klinikai vizsgálatokban korábban kimutattuk, hogy az IPRE hatékonyságát csökkenti az életkor és néhány társbetegség, például a hiperkoleszterinémia és a cukorbetegség. Ugyanakkor néhány hím állatokon végzett preklinikai vizsgálat azt feltételezi, hogy a KVE-ben bekövetkező összetett szisztémás anyagcsereváltozások ellenére az IPRE általi kardioprotekció továbbra is fennmarad. Korábban arról számoltak be, hogy az IPRE a RISK és SAFE útvonalakon keresztül biztosítja kardioprotektív hatását 4 hétig fennálló 5/6-od nefrektómiával vagy adeninnel dúsított diétával kiváltott szubakut veseelégtelenségben hím patkányokban. A rövid távú veseelégtelenség kísérleti modelljei azonban nem feltétlenül tükrözik megfelelően a klinikai helyzetet, mivel a KVE gyakran hosszú ideig diagnosztizálatlan marad. Kutatócsoportunk azt találta korábban, hogy az IPRE még 30 héttel az 5/6-od nefrektómia után is csökkenti az infarktus méretét urémiában hím patkányokban.

## **2. A disszertáció célkitűzései**

Jelen disszertációban céljaink a következők voltak:

- i) a miR-212 szerepének vizsgálata
- ii) ill. LVH-val és a fibrózissal kapcsolatos néhány kiválasztott targetjének (FOXO3 és ERK2) az urémiás kardiomiopátia kialakulásában betöltött lehetséges szerepének a vizsgálata hím patkányokban,
- iii) az urémiás kardiomiopátia súlyosságának, az I/R-károsodás és az IPRE potenciális kardioprotektív hatásának az összehasonlítása hím és nőstény patkányokban KVE-ben,
- iv) továbbá, a RISK és a SAFE útvonalak lehetséges szerepének a vizsgálata az IPRE által kiváltott kardioprotekcióban kísérletes KVE modellünkben mindkét nemből.

## **3. Anyagok és módszerek**

A disszertáció két különböző tanulmányon alapul. Az első a miR-212 és kiválasztott targetjeinek, a FOXO3-nak és az ERK2-nek a szerepét vizsgálja az LVH és a fibrózis

kialakulásában KVE-ben hím patkányoknál. Erre az első tanulmányra a tézisben *miR-212 tanulmány*ként hivatkozunk. A második tanulmány az urémiás kardiomiopátia súlyosságát, az I/R károsodást, az IPRE által nyújtott kardioprotekciót, valamint az IPRE által kiváltott kardioprotekcióban a RISK és SAFE jelutak lehetséges szerepét vizsgálta KVE-ben mindkét nemből patkány modellben. Erre a második tanulmányra a tézisben *nemi különbségek tanulmány*ként hivatkozunk.

**3.1. Etikai Engedély:** A vizsgálat megfelel a *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996) útmutatójának. A kísérleti engedélyt Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (XV.1181/2013-2018) adta ki. A laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó valamennyi intézményi és nemzeti irányelvet betartottuk.

**3.2. Állatok:** A *miR-212 tanulmány*ban 66 felnőtt hím Wistar patkányt (250-300 g) használtunk. 30 állaton áloperációt végeztünk, 36 állat pedig 5/6-od nefrectomián esett át a KVE kiváltása érdekében. A *nemi különbségek tanulmány*ban 196 azonos korú nőtény (n=110, 9 hetes, 180-200 g) és hím (n=86, 9 hetes, 300-350 g) Wistar patkányt használtunk. 90 állat (46 hím és 44 nőtény) áloperáción esett át, 106 (40 hím és 66 nőtény) pedig 5/6-od nefrectomián a KVE kiváltása érdekében.

**3.3. Részleges (5/6-od) nefrektómia:** A kísérletes KVE-t 5/6-od nefrektómiával idéztük elő két ülésben pentobarbitális altatásban. Először a bal vese 1/3-át mindkét végén eltávolítottuk, majd egy héttel később a teljes jobb vesét távolítottuk el. Az áloperációk során csak a vesetokokat távolítottuk el. Mindkét műtét után povidon-jódot alkalmaztunk a bőrfelületre, és posztoperatív gyógyszerként nalbufin-hidroklorid fájdalomcsillapítót és enrofloxacin antibiotikumot adtunk 4 napig.

**3.4. Transztorakális echokardiográfia:** A szív morfológiáját és funkcióját transztorakális echokardiográfiával ítéltük meg, a -1, 4 és 8. követési héten a *miR-212 tanulmány* esetében, ill. a *nemi különbségek tanulmány* esetében csak a 8. héten. A patkányokat 2%-os izofluránnal altattuk, és 2D, M-módú, Doppler, szöveti Doppler illetve négyüregi felvételeket készítettünk GE Vivid7 (*miR-212 tanulmány*) ill. GE Vivid IQ (*nemi különbségek tanulmány*) ultrahang készülék segítségével phased array transzducerrel (GE 10S, 5,5-12 MHz a *miR-212 tanulmány*

ill. GE 12S-RS, 5.0-11 MHz *nemi különbségek tanulmány* esetén). Három egymást követő szív ciklus adatait egy tapasztalt vizsgáló elemezte vakon. A három mért adat átlagát használtuk fel a statisztikai analízishez.

**3.5. Szérum és vizelet laboratóriumi paraméterek:** A szérumparaméterek méréséhez mindkét vizsgálatban vért vettünk, a véna saphenából (csak a *miR-212 tanulmányban* a -1. és 4. héten) ill. a mellkasi aortából a 9. héten. Az állatokat a 8. héten 24 órára metabolikus ketrecbe helyeztük, hogy a vizeletből kreatinin- és fehérjesszinteket mérhessünk. A szérum karbamid- és kreatininszinteket kinetikus UV-módszerrel, ureáz és glutamát-dehidrogenáz enzimek felhasználásával, illetve Jaffe-módszerrel határoztuk meg. A fő vesefunkciós paramétert, a kreatinin clearance-t, egy standard képlet szerint számoltuk ki (vizelet kreatinin koncentráció [ $\mu\text{M}$ ]  $\times$  24 órás vizeletmennyiség [ml]) / (szérum kreatinin koncentráció [ $\mu\text{M}$ ]  $\times$  24  $\times$  60 perc). A reagensek és a platform analízátorok a Roche Diagnostics-tól származnak.

**3.6. Ex vivo szívperfúziók és szöveti mintavétel:** A *miR-212* vizsgálatban a szíveket izoláltuk és 5 percig Langendorff szerint perfundáltuk oxigénnel dúsított Krebs-Henseleit oldattal. Ezután a szívek tömegét megmértük, a bal és jobb kamrát szétválasztottuk, és a bal kamrából a papilláris izom magasságában keresztmetszetben mintát vettünk, és ezt 10%-os pufferelt formalinban fixáltuk későbbi szövettani elemzéshez. A bal kamrák többi részét frissen lefagyasztottuk és  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további biokémiai mérésekig. A *nemi különbségek tanulmány* során az izolált szíveket vagy nem kondicionáló, vagy prekondicionáló perfúziós protokollnak vetettük alá. A nem kondicionált szíveket (45 perc) aerob perfúciónak tettük ki, amelyet 35 perces globális iszkémia követett. A prekondicionált szíveket 5 perc iszkémia és 5 perc reperfúciónak vetettük alá 3 intermittáló ciklusban a 35 perces globális iszkémia előtt. A 2 órás reperfúzió végén a szívek tömegét megmértük, majd infarktusméret meghatározására vagy biokémiai mérések elvégzésére használtuk fel őket.

**3.7. Az infarktusméret meghatározása:** A reperfúzió befejeztével a szívek egy alsóportjában a pitvarokat eltávolítottuk, és a teljes kamrákat használtuk az infarktusméret meghatározására. Röviden, a fagyasztott kamrákat 7-8 egyenlő szeletre vágtuk, és trifetil-tetrazolium-klorid oldatba helyeztük, majd formaldehides fixálás és foszfátpufferes mosási lépések következtek. Ennek eredményeként a túlélő területek vörösre festődtek, míg a nekrotikus terület fehéres maradt. A festett szívszeletekről készült digitalizált képeket planimetriával értékeltük, és a szívizom elhalásának mértékét a rizikózóna százalékában fejeztük ki.

**3.8. A nemi ciklus meghatározása nőtény patkányoknál:** A nőtény állatok nemi ciklusát a szívperfúziós protokollok előtt vizsgáltuk, mivel az ösztrogén- és progeszteronszintek ingadozása befolyásolhatja az infarktus méretét és a fehérje expressziós szinteket. Célunk az volt, hogy a nőtény patkányokat a diösztrozus fázisban válasszuk ki, amikor a hormonszintek a legalacsonyabbak. A nemi ciklust 12 órával a szívperfúziók előtt határoztuk meg. A hüvelykenetet üveglemezekre helyeztük, Giemsa-oldattal festettük, a tárgylemezeket fénymikroszkópiával vizsgáltuk 40x-es nagyításon. Értékeltek a hüvelyi hámsejtek mennyiségét, morfológiáját és a limfociták jelenlétét.

**3.9. Hematoxin-eozin (HE) ill. picrosirius vörös és fast green (PSFG) festés:** A bal kamrák papilláris izom magasságából származó részét formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyazott blokkokat készítettünk belőlük. A blokkokból 5 µm vastagságú metszeteket vágunk és ezeket HE-nal vagy pedig PSFG-vel festettük. A szövettani metszeteket Panoramic Midi II szkennelrel (3DHitech, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk, és a digitális képeket 10×, 40×, ill. 100× nagyításon értékeltük. A digitális HE-festett metszeteken megmértük mintánként 100 kardiomiocita keresztmetszeti területét. A kardiális fibrózist a PSFG-festett metszeteken egy saját fejlesztésű programmal értékeltük.

**3.10. A bal kamrai miR-212 expressziójának vizsgálata RT-qPCR segítségével:** A miR-expresszió meghatározására RT-qPCR-t végeztünk miR-specifikus primerekkel. Az RNS-t a bal kamrából izoláltuk. A miR-212 kvantitatív kimutatásához a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan miRNA-212 ill. snoRNA (U64702) Assay-eket és Absolute Blue qPCR Mixet (Abgene, #AB-4136/B) használtunk a gyártó utasításai szerint. A normalizáláshoz a snoRNS U64702 háztartási gént használtuk.

**3.11. Az mRNS-expresszió profilozása RT-qPCR segítségével:** A miR-212 vizsgálatban az RNS-t a Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit segítségével izoláltuk szívszövetből. Röviden, a teljes RNS-t a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével cDNA-re írtuk át, és a *Foxo3*-ra specifikus primereket és FastStart Essential DNA Green Master mixet használtunk a gyártó utasításai szerint. A gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*Gapdh*), a hipoxantin-foszforibozil-transzferáz 1 (*Hprt1*), a peptidil-proilizomeráz A (*Ppia*) és a riboszomális fehérje oldalsó szár P2 alegység (*Rplp2*) háztartási gének kontrollként szolgáltak a normalizáláshoz. A *nemi különbségek tanulmány* során a teljes RNS-t a bal kamrából Biozol



teljes RNS extrakciós reagens és kloroform 5:1 arányú keverékével izoláltuk. A vizes fázist tartalmazó RNS-t izopropanollal csaptuk ki. Ezután 100 µg teljes RNS-t cDNS-re írtuk át az iScript™ cDNS Synthesis Kit segítségével. Specifikus primereket (*Nppa*: A-típusú natriuretikus peptid és *Nppb*: B-típusú natriuretikus peptid) és SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermixet használtunk a gyártó utasításai szerint. A peptidil-prolil izomeráz A (*Ppia*) háztartási gént kontrollként használtuk a normalizáláshoz.

**3.12. Western blot:** A *miR-212 tanulmány*ban standard Western blot technikát alkalmaztunk a FOXO3, a protein kináz B (AKT), az extracelluláris jel szabályozott kináz 1/2 (ERK1/2) teljes és foszforilált (p) formáinak kimutatására GAPDH-t használva kontrollként. A *nemi különbségek tanulmány* során az AKT, az ERK1/2 és a signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) teljes és foszforilált (p) fehérjeszintjét vizsgáltuk GAPDH kontroll használatával. Mindkét vizsgálatban a bal kamrai szövetmintákat homogenizáltuk, majd a felülúszó fehérjekoncentrációjának meghatározása után nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat blokkoltuk, majd egy éjszakán át primer antitestekkel inkubáltuk. A *miR-212 tanulmány*ban a membránokat tormaperoxidázzal (HRP) konjugált kecskében termeltetett anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. A foszforilált fehérjék mennyiségének a meghatározása után a membránokat *strippeltük*, és újra felhasználtuk őket a totál fehérjék mennyiségének a meghatározásához. A kemilumineszcens jeleket a Quantity One szoftverrel elemeztük és értékeltük. A *nemi különbségek tanulmány* során a membránokat IRDye® 800CW kecskében termeltetett anti-nyúl és IRDye® 680RD kecskében termeltetett anti-egér másodlagos ellenanyaggal (Li-Cor) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, 5% BSA oldatban. A fluoreszcens jeleket Odyssey CLx készülékkel detektáltuk, a digitális képeket pedig a Quantity One szoftverrel elemeztük és értékeltük.

**3.13. Statisztikai elemzés:** A statisztikai elemzést a Sigmaplot 12.0 for Windows (Systat Software Inc.) segítségével végeztük. Minden értéket átlag ± SEM értékben adtunk meg. A  $P < 0,05$  értéket statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintettük. A *miR-212 tanulmány*ban kétmintás t-próbát (az adatok normális eloszlása esetén) vagy Mann Whitney U-tesztet (az adatok nem normális eloszlása esetén) alkalmaztunk az egyes követési időpontokon belül minden mért paraméterekre. A *nemi különbségek tanulmány* során a kiindulási és a különböző követési adatokat, köztük a szérum metabolit koncentrációkat és az echokardiográfiás, szövettani és RT-qPCR adatokat, kétutas varianciaanalízis (ANOVA) segítségével

hasonlítottuk össze. Az infarktusméretet és a Western blot mérési adatokat háromutas ANOVA segítségével hasonlítottuk össze.

## 4. Eredmények

### 4.1. A miR-212 tanulmány eredményei

#### 4.1.1. A KVE és az urémiás kardiomiopátia kialakulása

A szérum karbamid- és kreatininszintek a 4. héten és a végponton szignifikánsan megemelkedtek az 5/6-od nefrektomizált csoportban a kiindulási értékekhez és az áloperált állatok értékeihez képest minden követési időpontban, ami a folyamatosan romló vesefunkciót és a KVE kifejlődését jelzi. Továbbá az 5/6-od nefrektomizált patkányokban a vizelet fehérjekoncentrációja jelentősen megnövekedett, jelezve a glomeruláris funkció károsodását. Ennek megfelelően a kreatinin clearance is szignifikánsan csökkent az 5/6-od nefrektomizált patkányoknál mind a 4., mind a 8. héten az áloperált csoporthoz képest, ami a KVE kialakulását jelzi. Ezzel szemben a kreatinin clearance a végponton a kiindulási értékekhez képest szignifikánsan megemelkedett az áloperált csoportban, valószínűleg az egészséges állatok normális növekedésének köszönhetően.

A transztorakális echokardiográfia a -1. héten nem mutatott különbséget a mért paraméterekben a két csoport között. A 4. héten a KVE csoportban a diasztolés elülső és a szeptális falvastagság szignifikánsan megnövekedett az áloperált csoporthoz vagy a kiindulási értékekhez képest, amely kezdődő LVH-ra utal. A 8. héten a bal kamra falvastagságai, köztük a szisztolés és a diasztolés elülső és a szeptális falak, szignifikánsan megnövekedtek a KVE csoportban az áloperált csoporthoz és a kiindulási értékekhez képest, amely LVH jelenlétére utal. Az ejekciós frakció változatlan maradt a KVE csoportban a 4. és a 8. héten az áloperált csoporthoz és a kiindulási értékekhez képest. A korai áramlási sebesség (E) és a szeptális mitrális gyűrű elmozdulási sebesség (e') aránya a 8. héten jelentősen megnőtt a KVE csoportban, amely diasztolés diszfunkcióra utal. A szív tömege és a szív tömegének a testtömeghez viszonyított aránya szignifikánsan megnövekedett a KVE állatokban a kontrollokhöz képest, amelyek a hipertrófia makroszkópos jelei. A teljes bal vese tömege az áloperált csoportban kisebb volt, mint a remnant bal vese tömege a KVE csoportban, amely a KVE állatokban kifejezett vese hipertrófiára utal kompenzatórikus mechanizmusként.

A keresztmetszeti kardiomiocita átmérők szignifikánsan megnövekedtek a KVE csoportban az áloperált csoporthoz képest, igazolva az echokardiográfiai felvételeken és a boncoláskor

látott LVH kialakulását. Továbbá a KVE csoportban jelentős kardiális fibrózis alakult ki az áloperált csoporthoz képest.

#### ***4.1.2. Bal kamrai miR-212 és targetjeinek expressziós változása mRNS és fehérjeszinten urémiás kardiomiopátiában***

A miR-212 bal kamrai expressziója szignifikánsan megnőtt KVE-ben az áloperált csoporthoz képest. A bal kamrai FOXO3 szintje mRNS- és fehérjeszinten nem csökkent a KVE-csoportban az áloperált csoporthoz képest. Jelen vizsgálatunkban a bal kamrai pFOXO3 szint és a pFOXO3/FOXO3 arány nem emelkedett meg KVE-ben az áloperált csoporthoz képest. Az AKT bal kamrai expressziója fehérjeszinten nem különbözött a két csoport között. A pAKT expressziója azonban növekvő tendenciát mutatott a KVE csoportban az áloperált csoporthoz képest. A pAKT/AKT arány szignifikánsan nőtt KVE-ben az áloperált csoporthoz képest. A bal kamrai ERK1- és ERK2 szint, a pERK1 és pERK2, a pERK1/tERK1 arány, a pERK2/ERK2 arány nem változott szignifikánsan a KVE-ben az áloperált csoporthoz képest.

## **4.2. A nemi különbségek vizsgálat eredményei**

### ***4.2.1. A nemi különbségek hatása a KVE kialakulására és az urémiás kardiomiopátiára***

A szérum karbamid és kreatinin szintek közel egyezők voltak az áloperált hím és nőstény állatokban, de az 5/6-od nefrektomizált patkányoknál mindkét nemben szignifikáns emelkedést mutattak az áloperált állatokhoz képest. A szérum kreatinin szint szignifikánsan magasabb volt az 5/6-od nefrektomizált hím és nőstény patkányokban, mint az azonos nemű áloperált állatokban. A vizelet fehérje koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt az áloperált nőstényekben, mint a hímekben. A vizelet fehérje koncentrációja szignifikánsan megnövekedett a hím és nőstény 5/6-od nefrektomizált patkányokban az azonos nemű kontroll állatokhoz képest.

A transztorakális echokardiográfia során a legtöbb bal kamrai falvastagság nem különbözött szignifikánsan a hímek és nőstények között az áloperált csoportokban. A falvastagságok közül a diasztolés elülső és a szeptális falvastagság szignifikánsan kisebb volt az áloperált nőstényekben az áloperált hímekhez képest, kisebb testméretük miatt. A bal kamra végdiasztolés és végszisztolés átmérője szignifikánsan csökkent az áloperált nőstényekben az áloperált hímekhez képest. A KVE hatására a szisztolés és diasztolés elülső falvastagság mindkét nemben szignifikánsan megnőtt az azonos nemű áloperált állatokhoz képest. A KVE hímeknél a diasztolés inferior, poszterior és szeptális, valamint a szisztolés szeptális falvastagságok szignifikánsan megnövekedtek az áloperált hímekhez képest. Ezzel szemben a

KVE nőstények falvastagság növekedése kisebb volt, mint a KVE hímeké. A KVE nőstényeknél a diasztolés inferior, diasztolés és szisztolés szeptális falvastagságok szignifikánsan megnövekedtek az áloperált nőstényekéhez képest. A bal kamrai végdiasztolés és végszisztolés átmérők nem mutattak szignifikáns különbséget a KVE-re adott válaszban egyik nemnél sem. A bal kamrai végszisztolés átmérő azonban a hímekben a KVE hatására csökkenő tendenciát mutatott, valószínűleg a súlyosabb LVH miatt. A bal kamrai végdiasztolés térfogat, a verőtérfogat és a perctérfogat szignifikánsan csökkent a KVE hímeknél az áloperált hímekhez képest. Ezzel szemben ezek a paraméterek nem változtak szignifikánsan a KVE nőstényekben az áloperált nőstényekhez képest. A fő szisztolés funkcionális paraméter, az ejekciós frakció nem változott szignifikánsan a csoportok között. A diasztolés funkció echokardiográfiás értékelésére megmértük az E- ill. e' sebességet. Az E- ill. az e' sebességek szignifikánsan megemelkedtek az áloperált és a KVE nőstényeknél az áloperált KVE hímekhez képest. Az E nem változott szignifikánsan KVE hatására egyik nemnél sem. Ezzel szemben az e' szignifikánsan csökkent KVE hatására mindkét nemből, amely a diasztolés diszfunkció jelenlétére utal a KVE-ben. Mind a hímeknél, mind a nőstényeknél szignifikánsan megnövekedett a kardiomiociták átmérője KVE-ben az azonos nemű áloperált csoportokhoz képest, amely mikroszkóposan bizonyítja a kardiomiocita hipertrófia kialakulását. Azonban a KVE vagy az áloperált csoportokon belül nem volt szignifikáns különbség a kardiomiocita átmérőkben nemiek között. A hím KVE csoportban a bal kamra kollagéntartalma szignifikánsan megnövekedett a hím áloperált csoporthoz képest, amely bizonyítja a kardiális fibrózis kialakulását KVE-ben. A kollagéntartalomban nem volt különbség a hím és a nőstény állatok között az áloperált csoportokban. A nőstények testtömege és tibiahossza szignifikánsan alacsonyabb volt mind az áloperált, mind a KVE nőstényeknél az áloperált és a KVE hímekhez képest. A KVE hímek ill. nőstények testtömege és tibiahossza szignifikánsan alacsonyabb volt az azonos nemű áloperált állatokhoz képest, ami a mindkét nemből hasonló súlyosságú urémiás cachexia kialakulására utal. A szív, a bal kamra, a tüdő és a vese tömege a nőstényeknél szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a hímeknél a KVE-től függetlenül a nőstények kisebb testmérete miatt. A bal kamra tömege KVE esetén mind a hímeknél, mind a nőstényeknél szignifikánsan megnövekedett az áloperált hímekhez, illetve nőstényekhez képest, amely alátámasztja az LVH kialakulását. Érdekes módon a bal vese tömege az áloperált hímeknél ill. nőstényeknél jelentősen nagyobb volt, mint a remnant bal vese tömege a KVE hímeknél ill. nőstényeknél, ami kompenzációs vese hipertrófiára utal a KVE állatokban.

#### **4.2.2. Az IPRE kardioprotektív hatása és a SAFE és RISK útvonalak szerepe urémiás kardiomiopátiában**

Az IPRE szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét az áloperált és a KVE hímeknél és nőtényeknél is. A KVE azonban egyik nemben sem befolyásolta szignifikánsan az infarktus méretét. Kiemelendő, hogy az infarktus mérete szignifikánsan kisebb volt mind az I/R alcsoportban az áloperált, mind a KVE nőtényeknél, szemben az I/R alcsoportban az áloperált és a KVE hímekekkel, amely a jelzi női nem kifejezett kardioprotektív hatását a KVE fennállásától függetlenül. Az IPRE szignifikánsan megnövelte a pSTAT3/STAT3 arányt az áloperált hímek és nőtények esetében az azonos nemű I/R alcsoportokhoz képest, de nem változtatta meg szignifikánsan a pSTAT3/STAT3 arányt a KVE hímek és nőtények esetében a KVE I/R alcsoportokhoz képest. A nőtény áloperált I/R és IPRE alcsoportokban a pSTAT3/STAT3 arány szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az áloperált hím I/R és IPRE hím alcsoportokban. A KVE megszüntette a női nem e pSTAT3/STAT3 arányt csökkentő hatását az I/R és IPRE alcsoportokban a hím I/R és IPRE KVE alcsoportokhoz képest. Érdekes módon a foszfo-STAT3/STAT3 arány szignifikánsan magasabb volt a KVE hímek és nőtények esetében az I/R alcsoportokban, összehasonlítva az áloperált, azonos nemű I/R alcsoportokkal. A KVE e pSTAT3/STAT3 arányt növelő hatása nem volt kimutatható az IPRE szívekben az áloperált IPRE alcsoportokhoz képest egyik nemben sem. A pAKT/AKT és pERK1/2/ERK1/2 arányok tekintetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között.

### **5. Következtetések**

Eredményeinkből az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- i) Az LVH és a fibrózis bal kamrai miR-212 overexpresszióval jár együtt KVE-ben hím patkányokban.
- ii) Ezzel szemben a kiválasztott hipertrófiával és fibrózissal kapcsolatos miR-212 target gének (a FOXO3 és az ERK2) bal kamrai expressziója nem változott szignifikánsan urémiás kardiomiopátiában. Ezért úgy tűnik, hogy az LVH és a fibrózis kialakulásának molekuláris mechanizmusa KVE-ben különbözik más hipertrófia- és patológiás kardiális átépülési formáktól.
- iii) A szérum karbamid- és kreatininszint, valamint a kreatinin clearance alapján nem volt különbség a KVE súlyosságában a hím és nőtény patkányok között.
- iv) Az echokardiográfiás és a szövettani eredmények alapján a hímegekben súlyosabb bal kamrai hipertrófiával és fibrózissal járó urémiás kardiomiopátia alakult ki a nőtényekhez képest.

v) Az infarktus mérete szignifikánsan kisebb volt a nőstényekben, mint a hímekben mind az áloperált, mind a KVE csoportokban.

vi) Az IPRE infarktusméretet csökkentő hatása mindkét nemben megtartott maradt KVE-ben, annak ellenére, hogy a hím KVE patkányoknál súlyosabb urémiás kardiomiopátia alakult ki.

vii) Az IPRE szignifikánsan növelte a pSTAT3/STAT3 arányt az áloperált csoportokban mindkét nemben, viszont KVE-ben ez nem volt megfigyelhető. Ezért további kutatásokra van szükség azon kulcsfontosságú molekuláris mechanizmusok azonosításához, amelyek szerepet játszhatnak az IPRE KVE-ben kifejtett kardioprotektív hatásaiban.

## **6. Támogatók**

Projektjeink megvalósítását és a publikációkat a GINOP-2.3.2-15-2016-00006, GINOP-2.3.2-15-2016-00040, NKFIH K115990, NKFIH FK129094, EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER), valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma (20391-3/2018/FEKUSTRAT) pályázatok támogatták. Márványkövi Fanni a Szegedi Tudós Akadémiai Program támogatásában részesült. A Szegedi Tudós Akadémia Program a Szegedi Biomedicinális Tudományok Jövőjéért Alapítvány Szegedi Tudós Akadémia Programja az Emberi Erőforrások Minisztériumának támogatásával valósult meg (TSZ:34232-3/2016/INTFIN).

## **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, ill. Dr. Csont Tamásnak az SZTE SZAOK Biokémiai Intézet jelenlegi vezetőjének, akik lehetővé tették számomra, hogy az intézetükben folytassam tudományos munkámat az elmúlt években. Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Szegedi Tudós Akadémiának, ahol Szent-Györgyi hallgató voltam 2016-2019 között Dr. Csont Tamás és Dr. Sárközy Márta mentorálása alatt. Szeretném köszönetemet kifejezni PhD témavezetőmnek, Dr. Sárközy Mártának, aki segítségével és lelkesedésével végigkísért a disszertációm elkészüléséig.

Hálás vagyok továbbá Dr. Szücs Gergőnek, Dr. Dajka Dalmának és Ungi Ilonának a KVE projektekben végzett munkájukért. Szeretném kifejezni köszönetemet a Biokémiai Intézet minden munkatársának a kísérleteink során nyújtott folyamatos támogatásukért. Szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Kovács Zsuzsannának és Dr. Kovács Mónikának, felsőbb éves

hallgatótársaimnak majd PhD hallgatóknak, akik mindig megmutatták a helyes utat és segítettek munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Laboratóriumi Medicina Intézetből Dr. Földesi Imrének és Siska Andreának a szérum és vizelet paraméterek leméréséért, valamint a Patológiai Intézetből Prof. Dr. Cserni Gábornak és Dr. Kővári Bencének, hogy lehetővé tették a fibrózis elemző szoftver használatát. Hálás vagyok a Hannoveri Orvostudományi Egyetem Molekuláris és Transzlációs Terápiás Stratégiák Intézetéből (IMTTS) Prof. Thomas Thumnak és Dr. Bátкаи Sándornak a miR-212 és a targetek mérése során nyújtott segítségükért.

Nagyon hálás vagyok továbbá klinikai munkatársaimnak, Dr. Buzogány Istvánnak, Dr. Beöthe Tamásnak, Dr. Fazekas Fruzsínának, Dr. Dombovári Péternek és Dr. Máté Kingának, hogy támogatták a PhD disszertációm befejezését. Mindezek mellett, külön hálával tartozom egész családomnak és kedves páromnak, mert mindez nélkületek nem valósulhatott volna meg.

### Rövidítésjegyzék

**AKT:** protein kináz B

**AMI:** akut miokardiális infarktus

**AMPK:** AMP-aktivált protein kináz

**ANOVA:** varianciaanalízis

**BNP:** B-típusú natriuretikus peptid

**KVE:** krónikus veseelégtenség

**CVD:** szív- és érrendszeri betegség

**ERK1/2:** extracelluláris jel-szabályozott kináz 1/2

**ESRD:** végstádiumú veseelégtelenség

**FOXO3:** Forkhead Box O3

**GAPDH:** gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

**GFR:** glomeruláris filtrációs ráta

**HE:** hematoxilin-eozin

**I/R:** iszkémia/reperfúzió

**IPRE:** iszkémiás prekondicionálás

**LVH:** bal kamrai hipertrófia

**PSFG:** pikroszíriusz vörös és fast green festés

**RISK:** *reperfusion-induced salvage kinase*

**RNS:** ribonukleinsav

**RT-qPCR:** valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció

**SAFE:** *survivor activating factor enhancement*

**STAT3:** *signal transducers and activators of transcription 3*