

**A posztisztkémiás vese működésének javulása késleltetett
ellenoldali nefrektómiát követően:
A gyulladáshoz vezető folyamatok és a microRNAs-ek szerepe**

Doktori tézisek

Tod Pál

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Hamar Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szénási Gábor, C.Sc, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Losonczy György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Ambrus Csaba Kálmán, belgyógyász, nefrológiai
szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Reusz György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Terebessy Tamás, igazgatóhelyettes, egyetemi tanársegéd
Cselenyák Attila, kutató

Budapest

2021

1. Bevezetés

Az akut vesekárosodás (acute kidney injury, AKI) és a krónikus veseelégtelenség (chronic kidney injury) morbititási és mortalitási aránya világszerte magas. Az akut vesekárosodás egyik leggyakoribb oka a vese iszkémia-reperfúziós (ischemia-reperfusion, IR) károsodása. Továbbá az akut vesekárosodás a krónikus veseelégtelenség kialakulásának egyik fő rizikótényezője.

Iszkémiás körülmények között a vesetubulus epitélium sejtjei apoptózissal vagy nekrozissal elpusztulnak. Ennek következtében úgynevezett veszély-asszociálta molekuláris minták szabadulnak fel, amelyek gyulladást váltanak ki, mint például megindul a gyulladástól a citokinek, kemokinek és a komplement rendszer elemeinek termelődése. A kemokinek szerepet játszanak a fehérvérsejtek sérülés helyéhez való toborzásában. A beszűrődő neutrophil-, és makrofágsejtek hozzájárulhatnak a gyulladástól a folyamatokhoz. Amennyiben az iszkémiás esemény mérsékelt, rövid ideig áll fenn, úgy a károsodott vese képes lehet adaptív gyógyulási folyamatokkal megőrizni strukturális egységét és funkcióképességét. Amennyiben az iszkémia-reperfúziós károsodás súlyos, hosszantartó vagy ismétlődő, úgy a sérült vese nem képes visszaállítani strukturális és funkcionális egységét és a végbemenő maladaptív gyógyulási folyamatok következtében krónikus veseelégtelenség alakulhat ki. Ezt a folyamatot akut vesekárosodás-krónikus veseelégtelenség átmenetnek hívják.

Az akut vesekárosodás-krónikus veseelégtelenség átmenet kórélettana még nem teljes mértékben ismert. A fő patológiás folyamatok közé tartozik a leukocita sejtek beszűrődése, amelyek fontos szerepet játszanak a gyulladástól a környezet

fenntartásában. Az érrendszer károsodása következtében hipoxia, és oxidatív stressz lép fel. Továbbá a vesében jelenlévő és beszűrődő fibroblaszt sejtek transzformációjával myofibroblaszt sejtek alakulnak ki, amelyek túlzott mértékű extracelluláris mátrix (ECM) termeléssel hozzájárulnak a tubulointerstitialis fibrózis kialakulásában. Emellett epigenetikai változások is végbemennek a sérült vesében, mint a microRNS (miRNS) expressziós mintázatok megváltozása. A miRNS-ek poszttranszkripciósan vagy transzlációs szinten szabályozzák célpontjukat, így szerepet játszhatnak az akut vesekárosodás-krónikus veseelégtelenség átmenetben.

Több állatmodellt is kidolgoztak az AKI és a CKD vizsgálatára. Az IR által kiváltott AKI modelleket két fő típusra oszthatjuk, a meleg vagy hideg IR kiváltotta vesekárosodásra. A meleg IR modellek további két fajtáját különböztethetjük meg, az egyoldali vagy kétoldali IR-t. Az egyoldali IR segítségével számításba vehetők a nem károsodott ellenoldali vese hatása is, ami egy későbbi időpontban eltávolítható. Az egyoldali IR késleltetett nefrektómia (Nx) modell előnye, hogy ezen metodika által súlyos vesekárosodás idézhető elő, valamint általa a posztisztkémiás vese funkcionális működése vizsgálható a kompenzáló ellenoldali vese hiányában.

2. Célkitűzés

Fő célunkként tűztük ki, hogy az egyoldali iszkémia-reperfúzió késleltetett nefrektómia modell alapján új, az akut vesekárosodás és krónikus veseelégtelenség klinikai terápiájában hasznosítható mechanizmusokat derítsünk fel. Ennek érdekében:

1. megvizsgáltuk a posztisztkémiás vese késleltetett ellenoldali nefrektómiát követő működés javulásának molekuláris hátterét, különös tekintettel a gyulladásos, fibrotikus, hipoxiás és oxidatív stressz folyamatokra.
2. célunk volt azon miRNS-ek meghatározása, amelyek szerepet játszhatnak a posztisztkémiás vese működésének javulásában.

3. Módszerek

3.1 Állatok

Hím, 20-25 g tömegű NMRI egereket használtunk minden vizsgálatunk során. Az állatokat általános állatházi körülmények között tartottuk szabad hozzáféréssel standard rágcsáló ételhez és vízhez.

3.2 Egyoldali iszkémia-reperfúzió késleltetett nefrektómiával

Ketamin+xilazin altatásban az egereken vagy 30 perces iszkémia-reperfúziót vagy álműtétet (sham, S) hajtottunk végre. 7 nappal később ellenoldali nefrektómiát vagy álműtétet végeztünk el. Így az alábbi csoportokat vizsgáltuk: Sham IR-Sham Nx (S-S), Sham IR-Nx (S-Nx), IR-Sham Nx (IR-S) és IR-Nx.

Hat kísérlet sorozatot hajtottunk végre összesen 134 egérrel. A kísérletek végpontjaként az alábbi napokat jelöltük ki az IR műtéteket követően: 7, 8, 10, 14, 28 és 140.

3.3 Mintagyűjtés

Vérmintákat az alábbi napokon gyűjtöttük: -1, 1, 6, 8, 10, 14 és hetente egy alkalommal a kísérlet időtartama alatt.

A veséket mind a nefrektómiát követően, mind a vizsgálatok utolsó napján gyűjtöttük. Kíméletes végpontként nyaki diszlokációt alkalmaztunk. A vena cava superior átvágásával az állatokat kivéztettük, a vért összegyűjtöttük. Ezt követően az egereket hideg fiziológiás sóoldattal perfundáltuk.

A veséket három részre osztottuk. Teljes RNS izoláláshoz a vese felső pólust TRI Reagent[®] oldatba mártottuk, ezt követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük. Szövetteni vizsgálatok elvégzéséhez vese átmetszetett gyűjtöttünk a hilus magasságában, majd 4%-os puffereelt formaldehid oldatba tettük. A vese alsó pólusát azonnal folyékony nitrogénbe merítettük fehérje mennyiség meghatározásának céljából.

Minden mintát -80°C-on tároltunk a vizsgálatok elvégzésének idejéig.

3.4 A vesefunkció vizsgálata

A posztisztkémiás vese funkcionális állapotát a plazma urea szint meghatározásával követtük nyomon enzimatis (UV) metodika szerint.

3.5 Kvantitatív reverz transzkripció polimeráz lánreakció (Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)

A 1 µg mennyiségű teljes RNS-t tartalmazó mintákból reverz transzkripció eljárásával cDNS-sé írtunk át random hexamer primerek és High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit felhasználásával. Az alábbi gének expresszióját mértük meg kvantitatív PCR (quantitative PCR, qPCR) segítségével: alfa-simaizom aktin (alpha-smooth muscle actin, α -SMA), kollagén 1a1 (collagen 1a1, Col1a1), komplement komponens 3 (complement component 3, C3), fibronectin 1 (fibronectin 1, FN1), hipoxia indukált faktor 1-alfa és 2-alfa (hypoxia inducible factor 1-alpha and 2-alpha, HIF-1 α and HIF-2 α), interleukin-6 (IL-6), lipocalin-2 (LCN2), C-C motívum kemokin 2 (C-C motif chemokine 2, CCL2), nukleáris faktor eritroid 2-kapcsolt faktor 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2), transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta, TGF- β), tumor nekrozis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha, TNF- α). 18S riboszómális RNS-t használtunk a génexpressziós szintek normalizálásához.

3.6 miRNA microArray

A posztisztkémiás vese működésének javulásában potenciálisan résztvevő miRNS-ek meghatározásához egy miRNS microArray vizsgálat lett elvégezve az Exiqon A/S cég által. Összesen 20 mintát mértek meg a 8 napos kísérletből, amelyeket a vese funkció, valamint a TNF- α és TGF- β expressziós szintek alapján választottunk ki. A 20 minta közül 6-6 az IR-S és IR-Nx csoportokból, míg 4-4 az S-S és S-Nx csoportokból került ki. Annak érdekében, hogy a miRNS microArray eredményei alapján talált releváns miRNS-ek

expressziós szintű változását megerősíthessük az alábbi 13 miRNS-t reverz transzkripció eljárással cDNS-sé írtuk át Applied Biosystems™ TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit felhasználásával, majd meghatároztuk az expressziós szintjeiket qPCR segítségével: laboratóriumi eger miRNS-(Mus musculus miRNA, mmu-miR)-21a-3p, mmu-miR-21a-5p, mmu-miR-142a-3p, mmu-miR-142a-5p, mmu-miR-146a-5p, mmu-miR-199a-3p/mmu-miR-199b-3p, mmu-miR-199a-5p, mmu-miR-214-3p, mmu-miR-223-3p, mmu-miR-762, mmu-miR-2137, mmu-miR-2861, mmu-miR-3102-5p.

3.7 Szövettan

Minden szövettani vizsgálat esetében a nem károsodott jobb vesét használtuk kontrollként. Minden festést paraffinba ágyazott vese metszeteken végeztünk el.

Perjódsv-Schiff (PAS) festést alkalmaztunk paraffinba ágyazott vesemetszeteken a vese tubulus károsodás vizsgálatához. Az alábbi patológiás elváltozásokat analizáltuk: 1. kefeszegély eltűnés, 2. tubulus dilatáció, 3. hialin lerakódás a tubulusban

Masson trikróm festéssel vizsgáltuk az tubulointerstitialis fibrózis mértékét. A tubulointerstitialis fibrózis mértékét 0-4-ig való pontozással határoztuk meg látóterenként.

F4/80 makrofág specifikus immunfestést alkalmaztunk a leukocita sejtek beszűrődésének vizsgálatához. A színreakciót diaminobenzidine (DAB) Quanto Chromogen kit segítségével idéztük elő. ImageJ szoftver segítségével minden szövettani képen meghatároztuk az F4/80-pozitív és a teljes pixel számot és ezek arányában adtuk meg a makrofág beszűrődés mértékét.

3.8 Útvonal elemzés

A miRNS-célpont hálózat vizsgálatához a sikeresen validált miRNS-ek használtuk fel. A miRNS-célpont interakciós hálózatokat a miRNAtarget szoftver segítségével határoztuk meg. Az alábbi miRNS-célpont interakciós adatbázisokat alkalmaztuk: miRDB v5.0, TargetScan Mouse 7.2, miRTarBase 8.0.

3.9 Immunblottolás (Western blot)

Annak érdekében, hogy a feltételezett miRNS és célpontja közötti funkcionális kapcsolatot megerősítsük, a CD2-asszociálta fehérje (CD2-associated protein, CD2ap) és a Plexin A2 (Plxna2) fehérjék szintjét immunblottolással meghatároztuk. A vese szövetet lízis pufferben homogenizáltuk, majd 20 µg fehérjét vittünk fel 4-20% poliakrilamid géltre, amelyen a szeparáció 90V-tal történt. A szeparációt követően a fehérjéket polivinilidén difluorid membránra vittük át, ezt követően a membránt blokkoltuk. A membránokat másnap reggelig az elsődleges antitestekkel inkubáltuk, majd lemostuk, és szobahőmérsékleten 2 órán keresztül a másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az újbóli mosási lépést követően a membránokat 5 percig erősített kemilumineszcens reagenssel inkubáltuk, hogy a fehérje specifikus sávokat detektálhassuk. A fehérje szintek normalizálásához a teljes fehérje mennyiséget használtuk.

3.10 Statisztika

Amennyiben a Bartlett teszt a varianciák szignifikáns inhomogenitását mutatta, tízes alapú logaritmikus transzformációt alkalmaztunk az adatok vizsgálata előtt. A lehetséges kilógó értékeket a ROUT metodikával ($p=0.01$) határoztuk meg, és ezeket az adatokat nem használtuk a

statisztikai analízis során. Két csoportot nem párosított, nem parametrikus Mann-Whitney teszt segítségével hasonlítottuk össze. Két vagy több csoport összehasonlításához egy- vagy két-utas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. Ezt követően a post-hoc analízist Dunnett vagy Tukey teszt segítségével folytattuk le. Az adatok feldolgozásához a GraphPad Prism v8.0.2 szoftvert használtuk. Az adott különbséget statisztikailag szignifikánsnak fogadtuk el, ha a P érték kisebb volt 0,05-nél.

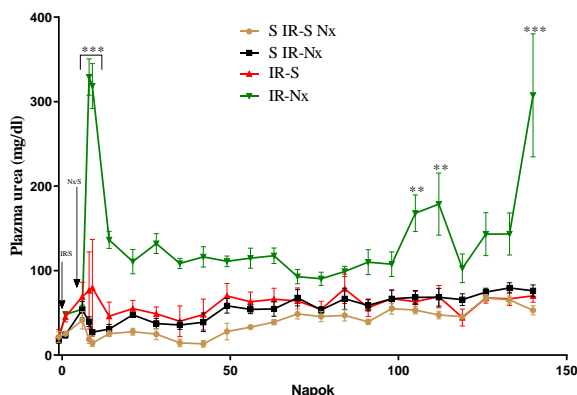
4. Eredmények

4.1 Az ellenoldali egészséges vese eltávolítása javította a posztisztkémiás vese működését

Ép ellenoldali vese jelenlétében a vese funkció jellemzésére használt plazma urea szint nem változott a súlyos egyoldali IR-t követően. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a nem károsodott vese képes gyorsan kompenzálni a súlyos egyoldali IR következtében létrejövő vese funkció csökkenését. Továbbá a 7. napon elvégzett ellenoldali nefrektómia felfedte, hogy a posztisztkémiás vese működése erőteljesen beszűkült. A plazma urea szint gyorsan és nagymértékben megemelkedett a Nx-t követően és pár napon keresztül emelkedett szintet mutatott. Mindazonáltal ez az emelkedés átmenetinek bizonyult, mivel már egy héttel az Nx után a plazma urea szint lecsökkent, és három héttel később már hasonló értékeket mutatott az álnefrektomizált egerekhez hasonlóan.

Egy hosszútávú kísérlet végeztünk el annak tisztázására, hogy az Nx-t követően kialakuló vesefunkció javulás tartósan vagy csupán időlegesen marad fenn. A kísérlet időtartama alatt nem tapasztaltunk különbséget S-S, S-Nx és IR-S csoportok között. Az IR-Nx csoport plazma urea szintje a nefrektómiát

követően nagymértékben megemelkedett, ám az a másik három csoporttal összevethető szintre csökkent a 14. napra, ahogyan az a rövid távú kísérletekben is látható volt. Ez a csökkenés csupán egy szűk tartományban változott az ezt követő hetekben. Ám a 19. héttől kezdve a plazma urea szint hirtelen megemelkedett az IR-Nx csoportban, és a 20. héten a kísérletet leállítottuk (1. ábra).



1. ábra. Vese funkció változás a hosszú távú kísérletben. IR: iszkémia-reperfúzió, Nx: ellenoldali nefrektómia, S: álműtét (sham)

4.2 Az ellenoldali vese nefrektómiája jelentősen csökkentette a tubuluskárosodás mértékét és gyulladásozó folyamatokkal összefüggő gének expresszióját

Az ép ellenoldali vesében nem tapasztaltunk szövettani károsodásra utaló jeleket egy vizsgált időpontban sem. A posztisztkémias IR-S vesében a tubuláris károsodás már a 8. napon kifejezett volt, a 28. napon pedig a vese atrofizált állapotúvá vált. Hasonlóképpen az IR-Nx csoportban is nagymértékű tubuláris károsodást mutattunk ki a 8. napon, ám a károsodás mértéke jelentősen lecsökkent a 28. napra, és nem

tapasztaltunk további romlást a 140. napig bezáróan, valamint atrofiát nem láttunk egy vizsgált időpontban sem.

A szövettani vizsgálatokat követően megvizsgáltuk a tubuluskárosodásra és gyulladós folyamatokra jellemző főbb gének expressziós szintű változásait.

A tubuluskárosodás marker LCN2 mRNS szintje jelentősen megemelkedett mindkét posztisztkémiás csoportban a kontrol veséhez képest, ám szignifikáns mértékben csökkent expressziós szintet mutatott az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz képest a 28 napon (1. táblázat).

A gyulladós citokin TNF- α és IL-6, a kemokin CCL2 és a komplement rendszer tag C3 markánsan megemelkedett az IR-S and IR-Nx csoportban az IR-t követő 4 hétben. A CCL2 és C3 mutatta a legnagyobb emelkedést a 10. napon (emelkedésük $124,4 \pm 22,5$ és $286,3 \pm 24,0$ -szoros emelkedés mutatott). Az ellenoldali nefrektómiát követően a vizsgált mRNS szintek már az Nx-t követő napon lecsökkentek az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz képest. Ez alól csupán az IL-6 expressziója mutatott kivételt, ami csupán a 14. napon mutatott jelentős mérséklődést (1. táblázat).

Tovább vizsgálva a gyulladós folyamatokat immunhisztokémiai festéssel megvizsgáltuk a makrofág infiltráció mértékét a posztisztkémiás vesékben. IR nagymértékű makrofág beszűrődést idézett elő mind az IR-S mind az IR-Nx csoportban a kontrol csoporthoz képest. A gyulladós gének csökkenésével megegyezően, az Nx jelentősen mérsékelte a makrofág sejtek jelenlétét az IR-Nx csoportban az IR-S csoporttal összevetve a 10. naptól kezdve.

4.3 Az ellenoldali nefrektómia hatására a hipoxia, oxidatív stressz és a fibrotikus folyamatokkal összefüggő gének expressziója lecsökkent a posztisztkémiás vesében

A hipoxia marker HIF-1 α és -2 α gének jelentősen emelkedett szintet mutattak a posztisztkémiás IR-S vesében a kontrol veséhez képest. Nem tapasztaltunk eltérést ezen gének expressziójában az IR-Nx csoportban az kontrol veséhez képest csupán a HIF-2 α esetében a 28. napon. Az oxidatív stressz marker NRF2 expressziója markánsan megemelkedett a posztisztkémiás IR-S és IR-Nx vesében a kontrol veséhez képest. Ám az Nx követően NRF2 mRNS szintje jelentősen lecsökkent az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz viszonyítva (1. táblázat).

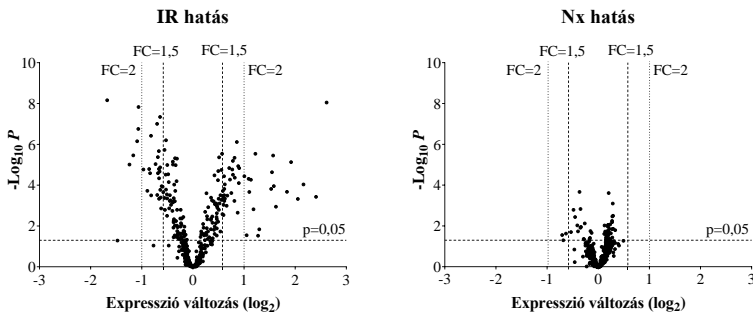
A myofibroblaszt marker α -SMA mRNS szintje jelentősen megemelkedett a posztisztkémiás IR-S és IR-Nx vesében a kontrol veséhez képest. Nx hatására az α -SMA expressziója fokozatosan csökkent és a 4 hétre statisztikailag szignifikáns mértékben lecsökkent az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz képest. A profibrotikus TGF- β gén expressziója markánsan emelkedett szintet mutatott a posztisztkémiás IR-S és IR-Nx vesében összevetve a kontrol veséhez képest. Az ellenoldali nefrektómia hatására a TGF- β mRNS szintje szignifikánsan mérséklődött a posztisztkémiás IR-Nx vesében az IR-S csoporthoz képest minden vizsgált időpontban (1. táblázat).

Az ECM fehérje Col1a1 és FN1 mRNS szintje markánsan megemelkedett az IR-S és IR-Nx csoportokban a kontrol csoporthoz képest. Ám e két gén expressziója 3 nappal az Nx-t követően a posztisztkémiás IR-Nx vesében az IR-S csoporthoz viszonyítva, ezáltal egy csökkent mértékű ECM felszaporodásra utalva (1. táblázat).

Valóban, a szövettani elemzés kimutatta, hogy míg az ép kontrol vese nem mutatott túlzott mértékű ECM depozíciót, addig a posztisztkémiás IR-S vesében a 8. naptól kezdve patológias szintű ECM felhalmozódás volt kimutatható. Nx hatására mérsékelt szintű ECM mennyiséget találtunk a posztisztkémiás IR-Nx vesében a 14. és a 28. napokon az IR-S csoporttal összevetve. Mindazonáltal az ECM depozíció kimutatható volt a 140. napig.

4.4 Az iszkémia-reperfúzió jelentős mértékben befolyásolta egyes miRNS-ek expresszióját

Az Exiqon cég által elvégzett miRNS microArray analízis kimutatta, hogy az IR-t követő 8. napon 20 miRNS szintje több mint kétszeres értékkel emelkedett, míg ugyanekkora mértékben 6 miRNS szintje csökkent a posztisztkémiás IR-S és IR-Nx vesékben a kontrol vesékhez képest. Ám az ellenoldali vese nefrektómiája csupán csekély mértékben befolyásolta a miRNS-ek expresszióját, egy miRNS sem változott legalább kétszeres értékkel az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz viszonyítva (2. ábra).



2. ábra. A miRNS microArray eredménye vulkán grafikonon ábrázolva. FC: relatív változás nagysága (fold change, FC) IR: iszkémia-reperfúzió, Nx: ellenoldali nefrektómia

Azon miRNS-ek expressziós változását próbáltuk meg megerősíteni RT-qPCR segítségével, amelyek legalább kétszeres változást mutattak, és azokét, amelyek a szakirodalom alapján szerepet játszhatnak az AKI kialakulásában. A mmu-miR-21a-5p, -2137, -142-3p, 223-3p, -142-5p, -199a-5p, -199a-3p/-199b-3p, -214-3p, -146a-5p miRNS-ek esetében az RT-qPCR eredmények alátámasztották a miRNS microArray által kapott eredményeket. A miR-21a-3p expressziója a várttal ellentétben némileg eltérőnek bizonyult, markánsan emelkedett szintet mutatott az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz képest.

IR hatására jelentősen megemelkedett a miR-21, -142a and -199a duplexek, valamint a miR-146a-5p, -214-3p and -223-3p miRNS-ek expressziója az IR-S and IR-Nx csoportokban a kontrol veséhez képest minden vizsgált időpontban. Az ellenoldali vese nefrektómiája nem változtatta meg a miR-21a duplex expresszióját. Ezzel ellentétben a miR-142a duplex szintje jelentős mértékben lecsökkent 3 nappal a nefrektómiát követően az IR-Nx csoportban az IR-S csoporthoz képest. Nx hatására a miR-199a két szálának az expressziója

különbözőképpen változott. Míg a miR-199a-3p esetében már a 14 napon markánsan csökkent szintet mértünk az IR-Nx csoportban, addig az -5p szál esetében csupán a 28. napon mérséklődött az IR-S csoporthoz viszonyítva. A miR-146a-5p expressziója markánsan lecsökkent az Nx-t követő 10. naptól kezdve a 28. napig a posztisztkémiás IR-Nx vesében a posztisztkémiás IR-S veséhez viszonyítva, valamint a kontrol vese expressziós szintjével összevethető értéket mutatott a 14. naptól kezdve. Nx hatására a miR-214-3p esetében a 14. naptól kezdve, míg a miR-223-3p esetében csupán a 14. napon tapasztaltunk jelentős mértékű expressziós szint csökkenést a posztisztkémiás IR-Nx vesében az IR-S veséhez képest (2. táblázat).

4.5 MiRNA- hálózat elemzés

A miRNS-célpont hálózat elemzést külön-külön végeztük el a posztisztkémiás IR-S és IR-Nx vesékben, hogy felderítsük az IR és Nx hatását a miRNS-célpont hálózatra az összes validált miRNS esetében. Az elemzés kimutatta, hogy számos potenciális gén több miRNS célpontja is lehet. Az IR hatás figyelembevételkor 4 gén esetében a predikció 4 szabályozó miRNS-t is kimutatott, ezen gének a Cd2ap, ciklin dependens kináz 17 (cyclin-dependent kinase 17, Cdk17), CREB3 regulátor faktor (CREB3 regulatory factor, Crebrf) és a Plxna2. Nx hatására csupán a Plxna2 gént szabályozza legalább 4 miRNS. Annak érdekében, hogy a miRNS-célpont analízis által prediktált funkcionális kapcsolatot megerősítsük, meghatároztuk a CD2ap (főként a glomeruláris epitéliális sejtekben expresszálódik) és Plxna2 (a podcitákban expresszálódik) fehérjék szintjét a 10. napi minták esetében, ám egy fehérje esetében sem találtunk a várakozásoknak megfelelő változást.

Gén	8. nap			10. nap			14. nap			28. nap		
	Kontr vs IR-S	Kontr vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	Kontr vs IR-S	Kontr vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	Kontr vs IR-S	Kontr vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	Kontr vs IR-S	Kontr vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx
LCN2	↑↑	↑↑	-	↑↑	↑↑	-	↑↑	↑↑	-	↑↑	↑↑	↓↓
C3	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	-
CCL2	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	-
IL-6	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	-	↑↑	↑↑	↓↓	↑	↑	-
TNF-α	↑↑	↑	↓	↑↑	↑	↓↓	↑↑	↑	↓↓	↑↑	↑	↓↓
HIF-1α	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-
HIF-2α	-	-	-	↑	-	↓	↑	-	↓	↑	-	-
NRF2	↑	↑	↓	↑	↑	-	↑	↑	↓	↑	↑	↓
α-SMA	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑	↓
TGF-β	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓
Col1a1	↑↑	↑↑	-	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓
FN1	↑↑	↑	-	↑↑	↑	↓	↑↑	↑	↓	↑↑	↑	↓↓

1. táblázat. Gén expressziós változások a posztisztkémias vesékben. Kontr: kontrol vese, IR-S: súlyos egyoldali iszkémia-reperfúzió ellenoldali nefrektómia nélkül, IR-Nx: súlyos egyoldali iszkémia-reperfúzió késleltetett ellenoldali nefrektómiával. -: statisztikailag nem szignifikáns különbség, ↑, ↓: relatív változás < 10, ↑↑, ↓↓: relatív változás > 10

Gene	Day 7			Day 8			Day 10			Day 14			Day 28			
	CtrI vs IR	CtrI vs IR-S	CtrI vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	CtrI vs IR-S	CtrI vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	CtrI vs IR-S	CtrI vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	CtrI vs IR-S	CtrI vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx	CtrI vs IR-S	CtrI vs IR-Nx	IR-S vs IR-Nx
miR-21a-3p	↑	↑	↑	↑↑	↑	↑↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
miR-21a-5p	↑	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
miR-142a-3p	↑↑	↑	↑	↑	↑↑	↑	↓	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓
miR-142a-5p	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑↑	↑↑	↑↑	↓
miR-146a-5p	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	-
miR-199a-3p	↑	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓
miR-199a-5p	↑	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓
miR-214-3p	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓
miR-223-3p	↑	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	-

2. táblázat. miRNA expresszió változások a posztisztkémias vesékben. Kontr: kontrol vese, IR-S: súlyos egyoldali iszkémia-reperfúzió ellenoldali nefrektómia nélkül, IR-Nx: súlyos egyoldali iszkémia-reperfúzió késleltetett ellenoldali nefrektómiával. -: statisztikailag nem szignifikáns különbség, ↑, ↓: relatív változás < 10, ↑↑, ↓↓: relatív változás > 10

5. Következtetések

Az ép ellenoldali vese jelenlétében a posztisztkémiás vese gyorsan fibrotizált és atrofizált.

Eredményeink megerősítik a korábbi eredményeket, miszerint a késleltetett ellenoldali nefrektómia hatására a posztisztkémiás vese funkciója javul, így a végstádiumú veseelégtelenség hosszabb idő alatt alakul ki.

A késleltetett ellenoldali nefrektómia hatására jelentős mértékben csökkentek a gyulladáshoz és fibrotikus folyamatokhoz, míg a hipoxia és oxidatív stressz folyamatok csupán enyhébb mértékben mérséklődtek.

Súlyos egyoldali iszkémia-reperfúzió következtében több miRNS expressziója is megemelkedett a posztisztkémiás vesében. A késleltetett ellenoldali nefrektómia hatására számos miRNS szintje lecsökkent azt mutatva, hogy ezen miRNS-ek szerepet játszhatnak a posztisztkémiás vese funkciójának javulásában és/vagy romlásának lassításában.

6. Saját publikációk jegyzéke

A tézis alapját képező publikációk

Tod P, Bukosza EN, Roka B, Kaucsar T, Fintha A, Krenacs T, Szenasi G, Hamar P. (2020) Post-Ischemic Renal Fibrosis Progression Is Halted by Delayed Contralateral Nephrectomy: The Involvement of Macrophage Activation. *Int J Mol Sci*, 21: 3825-3842.

Roka B, Tod P, Kaucsar T, Bukosza EN, Voros I, Varga ZV, Petrovich B, Agg B, Ferdinandy P, Szenasi G, Hamar P. (2021) Delayed Contralateral Nephrectomy Halted Post-Ischemic Renal Fibrosis Progression and Inhibited the Ischemia-Induced Fibromir Upregulation in Mice. *Biomedicines*, 9: 815-833.

A tézistől független publikációk

Revesz C, Wasik AA, Godo M, Tod P, Lehtonen, S, Szenasi G, Hamar P. (2021) Cold Saline Perfusion before Ischemia-Reperfusion Is Harmful to the Kidney and Is Associated with the Loss of Ezrin, a Cytoskeletal Protein, in Rats. *Biomedicines*, 9:30-41.

Calovi S, Mut-Arbona P, Tod P, Iring A, Nicke A, Mato S, Vizi ES, Tonnesen J, Sperlagh B. (2021) P2X7 Receptor-Dependent Layer-Specific Changes in Neuron-Microglia Reactivity in the Prefrontal Cortex of a Phencyclidine Induced Mouse Model of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*, 13: 566251-566273.

Tod P, Roka B, Kaucsar T, Szatmari K, Vizovisek M, Vidmar R, Fonovic M, Szenasi G, Hamar P. (2020) Time-Dependent miRNA Profile during Septic Acute Kidney Injury in Mice. *Int J Mol Sci*, 21: 5316-5332.

Roka B, Tod P, Kaucsar T, Vizovisek M, Vidmar R, Turk B, Fonovic M, Szenasi G, Hamar P. (2020) The Acute Phase Response Is a Prominent Renal Proteome Change in Sepsis in Mice. *Int J Mol Sci*, 21: 200-219.

Bukosza EN, Kaucsar T, Godo M, Lajtar E, Tod P, Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Tu NM, Schachner H, Soti C, Ferdinandy P, Giricz Z, Szenasi 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: 4266-4282.