

# Zárójelentés

OTKA 43788

Vezető kutató: Prof. dr. Wittmann István

Eredményeinket a pályázatban megfogalmazott hypothesisok szerint csoportosítva állítottuk össze. Egyes jelentős eredményeink még közlés alatt, illetve kidolgozás alatt állnak, emiatt kérjük, hogy a jelentésünkben foglaltak alapján született minősítést szükség esetén a később megjelenő közlemények figyelembe vételével az OTKA kiegészítő eljárásban módosítsa.

## **1. Hypothesis: Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gén I/D polimorfizmusa predisponál metabolikus szindrómára**

Igazoltuk, hogy az ACE II genotípust hordozók szénhidrátháztartása jobb, mint az ID-t vagy DD-t hordozóké. Az ACE-gátlót szedők szénhidrátháztartása jobb, mint az ilyen kezelésben nem részesülőké. Az oxidatív stressz markerének tekinthető a szérumban gamma-GT enzimaktivitás, ami a DD genotípusúak vérében a legmagasabb. Korrelációt mutattunk ki a subklinikai gyulladás markere, a CRP, és az oxidatív stressz paramétere, a gamma-GT között. Az ID+DD genotípust hordozók szignifikánsan több antihypertenzívumot szednek, mint az II-t hordozók. A DD genotípusúak vizelet albuminürítése szignifikánsan magasabb, mint az I allélt hordozóké.

## **2. Hypothesis: Az oxidatív és a karbonil stressz elsősorban a genetikailag predisponált egyénekben vezet öregedési betegségekhez.**

A kataláz és a glutation peroxidáz gén polimorfizmus vizsgálatát végeztük el 2-es típusú diabetesben szenvedőkben, amelyek közül a glutation peroxidáz esetében számolhatunk be pozitív eredményről. A kedvezőbb genotípust hordozók esetében a HDL koleszterin magasabbnak bizonyult. Laboratóriumunkban beállítottuk az endothelialis nitrogén monoxid szintáz (eNOS) endogén antagonistáinak (aszimmetrikus dimetilarginin, NG-monometilarginin, NMMA) mérését, amit fluoreszcens HPLC-vel végzünk. Érdekes összefüggést találtunk az endogén eNOS antagonisták és a glutation peroxidáz génpolimorfizmus között. A kedvezőbb genotípusúakban alacsonyabb volt az ADMA és az NMMA szérumban szintje. Ez azt bizonyítja, hogy a jobb antioxidáns enzimstátusz csökkenti az endothelialis károsodást azáltal, hogy csökkenti az eNOS endogén antagonistáinak a szérumban szintjét.

## **3. Hypothesis: A karbonil stressz egyik fontos kiváltó tényezője a metabolikus szindrómának.**

Ismert, hogy a karbonil stressz termékek fontos forrása a dohányfüst. Hypothesisünk szerint a reaktív karbonilokban gazdag dohányfüst szerepet játszhat a metabolikus szindróma pathogenezisében kulcs fontosságúnak tartott endothel-diszfunkció kialakulásában az

endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) enzim működésének diszregulációja révén. Endothelsejt tenyészetben Western blot technikával vizsgáltuk dohányfüst-puffer hatását az eNOS enzim foszforilációs szabályozására. Eredményeink a következőkben foglalhatók össze: 1. A dohányfüst idő- és koncentrációfüggően fokozza az eNOS gátló foszforilációját a 495-ös pozíciójú threoninon. 2. A dohányfüst idő- és koncentrációfüggően fokozza az eNOS aktiváló foszforilációját az 1177-es pozíciójú szerinen. 3. A gátló foszforiláció emelkedése minden koncentráció esetén és időpontban szignifikánsan meghaladja az aktiváló foszforiláció növekedését. 4. Az eNOS foszforiláció-változása az antioxidáns GSH-val részben kivédhető. 5. Mindez arra utal, hogy a dohányfüst hatására az eNOS enzim aktivitása valószínűleg csökken, ezt erősítik saját korábbi mérési eredményeink, miszerint a dohányfüst csökkenti az agonista-kiváltotta Ca-beáramlást és az endothelsejtek cGMP termelését is. A dohányfüst okozta eNOS-eltérések további vizsgálata során elvégeztük a dimer és a monomer enzim formák kimutatását. Az irodalomból ismert, hogy az eNOS normálisan dimer formában található. A dimer eNOS NO-t termel. Ha az eNOS monomer formában van, akkor az enzim szétkapcsolódik és NO helyett szuperoxid szabad gyököt termel. Igazoltuk, hogy az eNOS a dohányfüst hatására koncentrációfüggően monomer formába megy át. Vizsgáltuk az eNOS foszforilációját végző protein kináz A, B és C szerepét. Eredményeink szerint a dohányfüst eNOS foszforilációt kiváltó hatását a protein kináz A és B gátlása nem befolyásolta. Mind a nem szelektív protein kináz C inhibitor, mind pedig a szelektív protein kináz C  $\beta$  inhibitor (ruboxistaurin) hatékonyan csökkentette a dohányfüst eNOS-ra gyakorolt káros hatását. Vizsgáltuk a dohányfüst hatását a protein kináz B aktiváló foszforilációjára is és azt tapasztaltuk, hogy a dohányfüst hatására csökken az aktiváló foszforiláció. Ez azért fontos, mert az inzulin metabolikus hatásai a vázizomban, a májban és a zsírszövetben is a protein kináz B-n keresztül valósulnak meg. Ezen eredményeink angol nyelvű közlése folyamatban van.

Állatkísérletekben igazoltuk, hogy hím patkányok ventromediális hypothalamusába metilglioxált (agresszív dikarbonilt) juttatva az állatokban krónikusan fennmaradó szénhidrát anyagcsere zavar (csökkent glukóztolerancia), dyslipidaemia, hyperuricaemia és hypertonia jött létre. A kezelt állatok inzulinrezisztensekké váltak, szérum leptinszintjük növekedett. A kezelt állatok inzulinra és 2-dezoxi-D-glukózra a kontrollokhöz képest fokozott tápfelvétellel reagáltak. Az állatok pancreas szigeteinek morfológiája megtartott maradt, immunhisztológiával normális inzulin- és glukagon-megoszlást láttunk a szigeteken. Mindezek alapján metabolikus szindróma-szerű képet váltott ki a metilglioxál injekciója.

Vizsgáltuk az oxidatív stressz jelentőségét az érlemezésedés jó mérőszámának tartott carotis intima-média vastagság (IMT) kialakulásában diabeteses betegekben. Összefüggést találtunk az IMT és az oxidatív stressz paraméterének tartott homocystein, illetve tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák szérum szintje között. Az IMT fontos rizikójának tűnt a vesefunkció és a diabetes felfedezésének időpontjában mért kor is. Ez az eredmény alátámasztja azon irodalmi adatokat, amelyek szerint az érkárosodás megelőzi az anyagcsere betegséget, és éppen az endotheliális oxidatív károsodás vezet az anyagcsere-betegség kialakulásához.

Összefoglaló közleményünk jelent meg az inzulinválasz első fázisának csökkenése és az inzulinrezisztencia kapcsolatáról, melyben tárgyaljuk az oxidatív stressz lehetséges szerepét az inzulinrezisztencia kialakításában és az első fázisú inzulinszekrécióval való kapcsolatát.

#### **4. Hypothesis: A karbonil stressz aktiválja a renin-angiotensin-aldosteron rendszert.**

Az agyat ért karbonil stressz hatására metabolikus szindrómássá tett állatokban vizsgáltuk a vese állapotát, esetleges károsodásait. Korai renin felszaporodást tapasztaltunk a vese arteriolákban, a vesepapillák tubulointersticiumában. A renin akkumuláció kolokalizációja volt igazolható immun-elektronmikroszkópiával a tubulointersticiális kapillárisok endotheliumában az egyik karbonil stressz termék, az imidazon tekintetében.

#### **5. Hypothesis: A karbonil stressz oxidatív stresszt okoz.**

Vizsgáltuk az oxidatív stressz és a karbonil stressz (nem-enzimatis glikáció) összefüggéseit a fokozott oxidatív stresszel járó glomerulonephritisek egyik típusában, az úgynevezett IgA nephropathiában szenvedő betegekben. Ebben igazoltuk a következőket: 1. A glikációs végtermék karboximetil-lizin és a glikoxidációt jelző speciális szérumszintje a vesefunkció beszűkülésével emelkedik. 2. Az oxidatív stresszt jelző tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák (TBARS) szintje magasabb volt a normális vesefunkciójú IgA nephropathiásokban, mint a kontroll személyekben. A vesefunkció romlásával ez nem emelkedett tovább. 3. Az LDL oxidatív rezisztenciája és az LDL-hez kötött TBARS koncentrációja az IgA nephropathiás betegekben magasabb volt, mint a kontroll személyekben. 4. A szénhidrát anyagcsere kóros volta nem befolyásolta az IgA nephropathiás betegekben a fluoreszcenciát, a karboximetil-lizin szintet és az oxidatív stressz paramétereket.

A fokozott oxidatív stresszel járó glomerulonephritisekben a vizelet-üledékben glomeruláris típusú (dysmorph) vörösvértetek figyelhetők meg. In vitro vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a karbonil stressz miatt felszaporodó metilglioxál lehet az oka a dysmorph vörösvértetek kialakulásának. Eredményeink szerint ez a dikarbonil molekula oxidatív stresszt okoz a vörösvértetekben, és olyan morfológiai elváltozáshoz vezet, ami megegyezik a betegek vizeletüledékében látott vörösvértet dysmorphitással. A metilglioxál kiváltotta dysmorph vvt képződés az antioxidáns redukált glutationnal részben kivédhető volt.

A diabetes mellitus okozta károsodások egyik predilekciós helye a vese. Ennek hátterében a tubulus-sejtekben a glukozuria által kiváltott oxidatív stressz állhat. Fokozott karbonil stresszel járó állapotokban, így 2-es típusú diabetes mellitusban (DM), azotaemiában (AZOT) és diabeteszes azotaemiában (DM-AZOT) vizsgáltuk az oxidatív stressz mértékét. Ennek érdekében ezen betegcsoportokban megmértük a hidroxil szabadgyök-marker orto-tirozin (o-Tyr) és a fiziológiás aminosav para-tirozin (p-Tyr) szérumszintjét, vizelet ürítését és renális transzportját. Kimutattuk, hogy a cukorbeteg vizeletében a glukóz koncentrációja elérheti a 200-300 mmol/literes értéket is, ami a vese tubulusokban extrémfokú oxidatív stresszt okozhat. Az AZOT és DM-AZOT csoportok plazma p-Tyr szintje és vizelet p-Tyr ürítése alacsonyabb az egészséges kontrollokhoz (CONTR) és a DM-hez képest. A p-Tyr frakcionált excretioja (Fex) minden csoportban 2% alatti. A plazma o-Tyr szintekben nincs különbség a csoportok között. Az o-Tyr vizelet ürítése fokozott az AZOT csoportban a CONTR-hoz képest, még magasabb a DM és DM-AZOT csoportokban. Az o-Tyr Fex értéke a DM és a DM-AZOT csoportokban magasabb a kontroll csoportéhoz képest és mindkét csoport átlaga 100% feletti. Ezen eredmények azt jelzik, hogy a minimális szerkezeti különbség ellenére a fiziológiás p-Tyr és a szabad gyök-marker o-Tyr renális transzportja eltérő. A 100% feletti o-Tyr Fex értéke arra utal, hogy a glukozuria a vese tubularis sejteiben hidroxil szabadgyök-

termeléshez vezet. Vizsgálatainkat kiegészítettük a lipidperoxidáció mérésére alkalmas 8-epi-prostaglandin-F<sub>2</sub>alfával. Megállapítottuk, hogy ez nem korrelált az orto-tirozin ürítésével.

Az előző bekezdésben részletezett betegcsoportokban vizsgáltuk azt a hipotézist, hogy a fokozott karbonil stresszel járó betegségek okozhatnak-e anaemiát, illetve ez befolyásolható-e antioxidáns-gyulladáscsökkentő adásával. Igazoltuk, hogy a diabetes mellitus (2-es típus), normál vesefunkció esetén is, csökkent haematocrit és haemoglobin szintet okoz. Ennek hátterében erythropoetin (EPO)-rezisztencia állhat. A DM-AZOT csoport adatai alapján az azotaemia és diabetes hatása az anaemiára és az EPO-rezisztenciára additív. Kimutattuk, hogy az antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatású acetilszalicilsav (ASA) rövid távú vizsgálatban kb. 50%-kal növeli a DM, az AZOT és a DM-AZOT betegek EPO szintjét. Az ASA 33 illetve 22%-kal növeli a reticulocyták számát és arányát. Az ASA kb. 7%-kal növeli a vvt számot, a hemoglobint és a hematokritot.

A diabeteszes és a szenilis cataracta kialakulásában is fontos szerepe van a karbonil stressznek; előbbi esetben a szénhidrát anyagcserezavar, utóbbi esetben valószínűleg az erre genetikailag hajlamos egyéneknél a normál öregedési folyamatok során zajló nem-enzimatis glikáció révén. Kollaborációban, a PTE ÁOK Szemészeti Klinkájával és a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetével együttműködve szenilis cataractás és diabeteszes cataractás lencsét hasonlítottunk össze nem-cataractás lencsékkel. Tanulmányoztuk a fehérjék megoszlását a lencsék vízdékony és vízdékhatalan fázisa között. Az oxidatív stressz felmérése céljából HPLC segítségével vizsgáltuk az oxidált aminosavak (meta-tirozin: m-Tyr; orto-tirozin: o-Tyr; dihidroxifenilalanin: DOPA) megoszlását a lencsefrakciók között. Eredményeink szerint a cataractás lencsék homogenizátumában a vízdékony fehérjék aránya alacsonyabb a nem-cataractás kontroll lencsékhez képest. A DOPA, az m-Tyr és az o-Tyr is felszaporodik a cataractás minták totál homogenizátumában, viszont a vízdékony frakcióban nem. Kétdimenziós elektroforézis vizsgálattal a cataractás minták vízdékhatalan frakciójában nagy molekulású fehérje-aggregátumokat lehetett kimutatni. Mindezek alapján elképzelhető, hogy a karbonil stressz nemcsak közvetlenül, hanem oxidatív stressz folyamatok kiváltásán keresztül is hozzájárul a lencsefehérjék oldhatatlanná válásához, ezáltal a cataractogenezishez.

Sejttenyészeteken végzett vizsgálatok, állatkísérletek és humán tanulmányok bizonyítják, hogy a karbonil stressz végtermékei, az előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-products, AGE) fontos szerepet játszanak a diabeteszes nephropathia és a krónikus vesebetegségek kialakulásában és progressziójában, illetve az atherosclerosis veszélyének a vesefunkció hanyatlásával együtt járó fokozódásában. Az AGE termékek ezen hatásai részben a renin-angiotenzin-aldosteron rendszer aktiválásával magyarázhatók. Megvizsgáltuk, hogy mely tényezők befolyásolják a szérumban AGE szintet krónikus uraemiás, hemodializált betegekben. Eredményeink szerint a hemodializált oligo-anuriás betegek szérumban AGE (karboximetil-lizin) szintje magasabb a nem-oliguriásokénál. A dohányzó hemodializált betegek szérumban AGE szintje magasabb a nem-dohányosokénál. A dohányzás és az oliguria hatása additív az AGE-szintre. A szérumban AGE-szint korrelál a béta-2-mikroglobulin szinttel. A magas AGE-szinttel rendelkező dializált betegek mortalitása 51 hónapos követés során szignifikánsan magasabbnak adódott az alacsony AGE-szintű dializált betegekhez képest. Ennek alapján az endogén AGE-képződés és az exogén AGE-bevitel egyaránt hozzájárulhat a veseelégtelen és dohányzó betegek fokozott mortalitásához. Az uraemiás, vesepótló kezelés alatt állók mortalitása független prediktorának bizonyult az AGE-termék karboximetil-lizin mellett a CRP is.

## **6. Hypothesis: A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és az oxidatív stressz interferál az inzulin hatásával.**

2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegekben a per os antidiabetikumról inzulin terápiára történő átállás során az eNOS aktivitását jelző különböző laboratóriumi paraméterek mérésével kívántuk igazolni az inzulin endothel functióra kifejtett kedvező hatását. Ismert, hogy az inzulin az Akt protein kinázon keresztül aktiválja az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS). Inzulinra történő áttérés előtt és után mértük a kilélegzett NO molekulák számát, HPLC-vel meghatároztuk a vizelettel ürített meta-tirozinnak, mint az oxidatív stressz stabil markerének mennyiségét, Western blot analízissel vizsgáltuk a thrombocyták Akt és foszforilált Akt tartalmát. Az inzulin a kilélegzett NO mennyiségét növelte. Ezzel egy időben a vizelettel ürített meta-tirozin mennyisége csökkent. A thrombocyták Akt és foszforilált Akt tartalma nőtt, míg a foszforilált Akt / Akt arány nem változott. Mindezek alapján az inzulin terápia bevezetése 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegekben kedvezően befolyásolhatja a vasculatura állapotát, javíthatja az endothel dysfunciót. Eredményeink közlése előkészítés alatt áll.

Saját eredményeinkre és az irodalmi adatokra támaszkodva hipotézis tanulmányt jelentettünk meg a metabolikus szindróma, a karbonil és oxidatív stressz és a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer összefüggéseiről, melyben arra a következtetésre jutottunk, hogy a renin-angiotenzin-rendszer aktivációja vasmobilizáción keresztül oxidatív stresszhez vezet, amely az inzulin-érzékenységet csökkentve metabolikus szindrómát indukálhat.

## **7. Hypothesis: A karbonil stressz által kiváltott metabolikus syndroma és diabeteses nephropathia eredményesen kezelhető angiotenzin konvertáló enzim gátlóval, angiotenzin receptor blokkolóval, aldoszteron antagonistával és antioxidánsal.**

Elkészítettük a Magyar Nephrologiai Társaság szakmai ajánlását a diabeteses nephropathiáról és az uraemiás diabeteses betegek kezeléséről. Mindezekből világossá válik, hogy az ACE-gátlók és az angiotenzin receptor blokkolók alkalmazása, akár kombinációban is, diabeteses nephropathiában az elsőként választandó kezelési mód. Összeállítottuk a pillanatnyi klinikai evidenciák alapján az angiotenzin konvertáló enzim-inhibitorok és az angiotenzin receptor blokkolók kombinációs használatának ajánlását is. Felkért összefoglaló tanulmányban tárgyaltuk a RAS rendszer másodlagos hírvivőjének, a protein kináz C-nek befolyásolásától várható terápiás előnyöket. A metabolikus syndroma két kritériumrendszeréről, a WHO és az ATPIII definícióról írtunk felkért, összefoglaló dolgozatot. Következtetésünk szerint mindkettő használható a magyar populációra, de a WHO kritériumrendszer alkalmasabbnak tűnik az inzulinrezisztencia kimutatására. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján összefüggést írtunk le a glikációs végtermékek (AGE) akkumulációja, az AGE receptorok működése, a nephronvesztés és az atherosclerosis között. Összefoglaló közleményt írtunk, felkérésre, a Nephrol Dial Transplant című folyóiratba az IgA nephropathia kezeléséről, amelyben tárgyaltuk a betegség kapcsolatát a metabolikus syndromával és részleteztük a renin-angiotenzin rendszerre ható szerek hasznát is.

UV-fluoreszcenciás HPLC módszert dolgoztunk ki cukorbeteg vizeletében ürített fehérjék egyidejű mennyiségi meghatározására és a fehérjék egyedi glikoxidációs állapotának megítélésére. A betegek több mint 90%-a állt ACE-gátló és/vagy angiotenzin receptor blokkoló kezelés alatt. Kimutattuk, hogy a vizeletben dimer és monomer formában fordul elő az albumin. A nephelometriával normoalbuminuriásnak nyilvánítottak között jelentős

számban fordultak elő HPLC-vel mikroalbuminúriás cukorbetegség. A dimer albumin mennyisége csökkent a monomer albumin mennyiségének növekedésével. A monomer albumin glikoxidáltsági foka magasabb volt a mikroalbuminúriások esetében, mint a normoalbuminúriás betegekben. Ezen eredményeink angol nyelvű közlése preparálás alatt áll.

Megvizsgáltuk, hogy diabeteszes betegekben az antioxidáns kezelés a "Francia paradoxon" hatóanyagának tekintett rezveratrol formájában jelent-e járulékos előnyt a RAS gátlás mellett alkalmazva. Eredményeink szerint a rezveratrollal kezelt cukorbetegségben csökkent a folyamatos cukormonitorozással meghatározott postprandiális cukorszint, szignifikánsan javult a HOMA indexel mért inzulinrezisztencia és szignifikánsan emelkedett az oxidatív stressz érzékeny erythropoetin termelés. Eredményeink közléséhez az adatok feldolgozása még folyamatban van.

Szintén a RAS gátlás mellett alkalmazott mikrocirkulációt javító kezelés hatékonyságát mértük fel diabeteszes neuropathiás cukorbetegségben. Eredményeink szerint a RAS gátlás mellett kiegészítő kezelésként adott pentoxifyllin és a pentozán-poliszulfát terápia javította az autonóm és szenzoros neuropathiát.

**Konklúzió** az, hogy a karbonil és az oxidatív stressz mind a metabolikus szindróma kialakulásában, mind pedig szövődményeinek létrejöttében fontos szerepet játszik. A genetikailag predisponált egyénekben a metabolikus szindróma és a következményes vesekárosodás a felgyorsult atherosclerosis révén korai halálhoz vezet. Az ér- és a vesekárosodás kialakulásában központi szerepet játszó renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerre irányuló kezelés illetve az antioxidáns terápia alkalmazása lassíthatja a metabolikus szindróma szövődmények progresszióját.