

## Beszámoló

Dr. Wagner László OTKA F68638-as pályázatáról (2007-2008)

### „A dohányzás hatása a cukorbetegség progressziójára: a nitrogén monoxid termelés és a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer szerepe”

#### 1. A cigarettafüst hatása az endoteliális nitrogén monoxid szintáz foszforilációjára: a protein kináz C szerepe

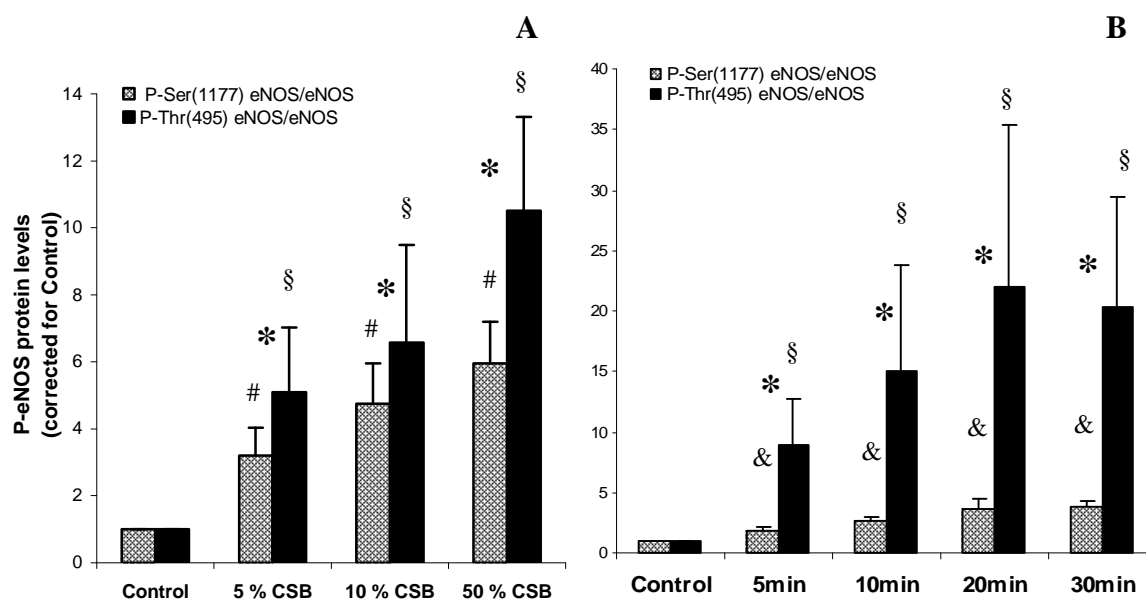
(Endothelium 14: 245-255, 2007)

Az endotélsejtekben a nitrogén monoxid (NO) szintázon (eNOS) serkentő és gátló szabályozási pontok vannak. Élettani körülmények között a serkentő pont aktivált, ugyanakkor a gátló pont tiltott állapotban van, így az enzim NO-t termel. Az NO-nak többféle jótékony hatása van: vazodilatatív, gátolja a trombocita aggregációt, illetve a fehérvérsejtek kitapadását az erek falához, így megakadályozza az erek eldugulását. E szabályozási pontokat több enzim, illetve folyamat befolyásolja: így a protein kináz A (pl. a nyíróerőn keresztül) és B (az inzulin-hatásán keresztül) aktivált állapotot, illetve a protein kináz C gátlást okoz. Az enzim NO-termeléséhez két eNOS molekula dimerizációja is szükséges, mivel monomer formában az enzim szuperoxidot termel.

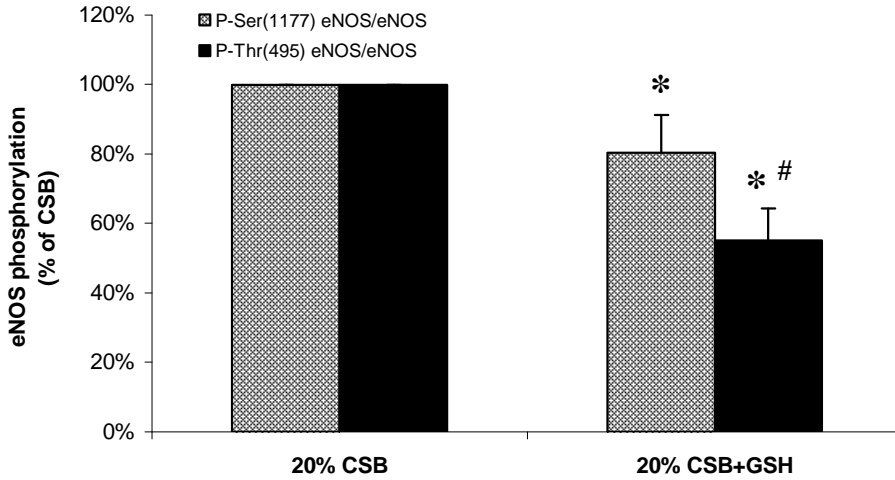
A 2-es típusú cukorbetegség, és a metabolikus szindróma részeként gyakran társultan előforduló elhízás, hipertónia, illetve ezek eredményeként a generalizált ateroszklerózis következtében sérül az endotélium, így az, NO termelés csökken, vagy meg is szűnik.

Eredményeink:

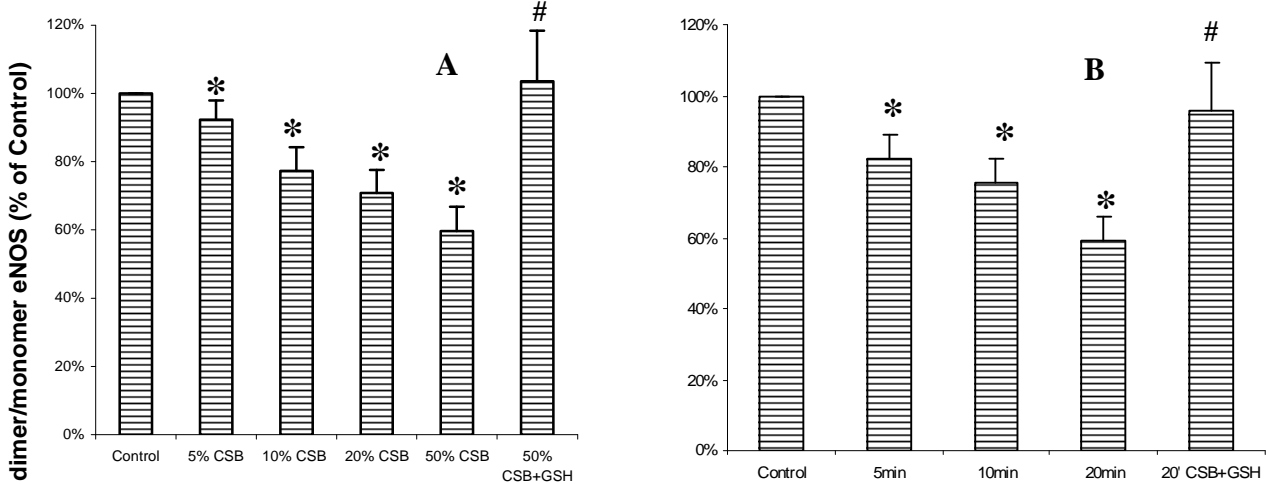
1. Dohányfüst-oldat (CSB) hatására *in vitro* endotélsejtekben a fenti szabályozás felborul. Bár a serkentő hely (P-Ser(1177)eNOS) aktivitása nőtt, azonban a gátló helyen (P-Thr(495)eNOS) jóval nagyobb mértékű gátlás alakult ki, mely összességében az enzim fokozott gátlását eredményezte. Ennek dózis- (A panel) és időfüggését (B panel) is kimutattuk (#,§,& vs. kontroll; \*aktiváló vs. gátló foszforiláció).



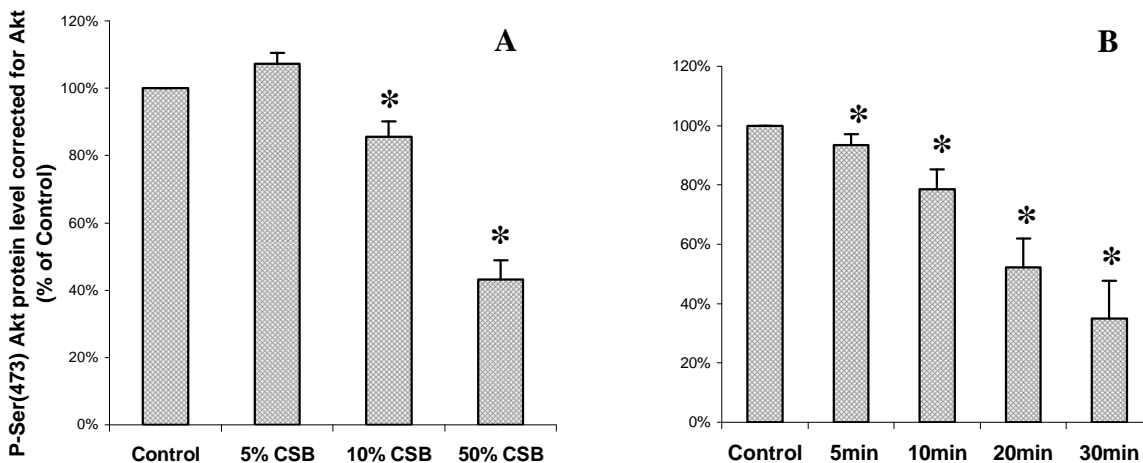
2. A cigarettafüst fenti hatását az antioxidáns redukált glutathion (GSH) kivédte: csökkent a dohányfüst okozta enzim-gátlás (jobban csökkent a gátló, mint az aktiváló foszforiláció, így összességében az eNOS aktiváció irányába tolódott a hatás) (\* vs. kontroll; # aktiváló vs. gátló foszforiláció).



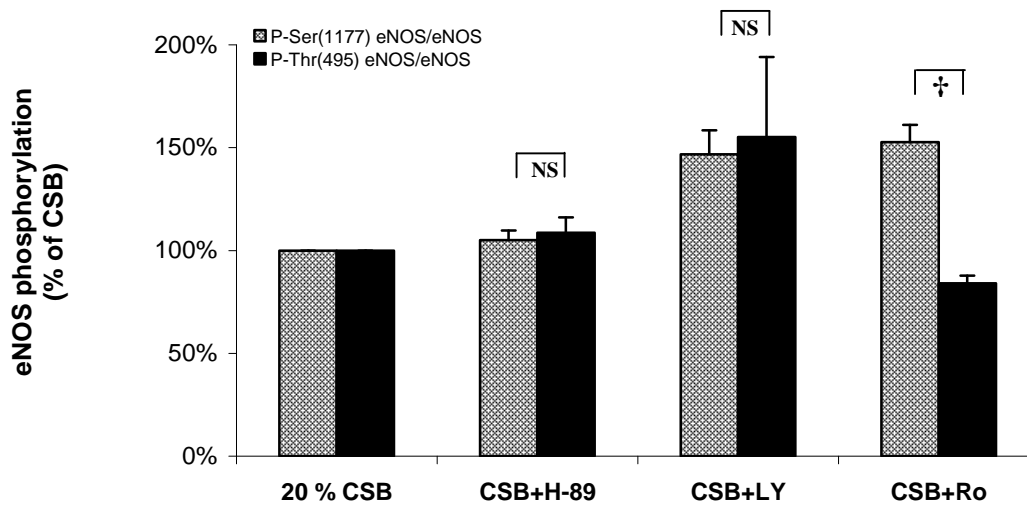
3. A dohányfüst-oldat az eNOS dimerizációját is gátolta, melyet a GSH szintén kivédett. Dózis- (A panel) és időfüggést (B panel) is láttunk (\* vs. kontroll; # vs. 50% CSB, illetve vs. 20 min CSB).



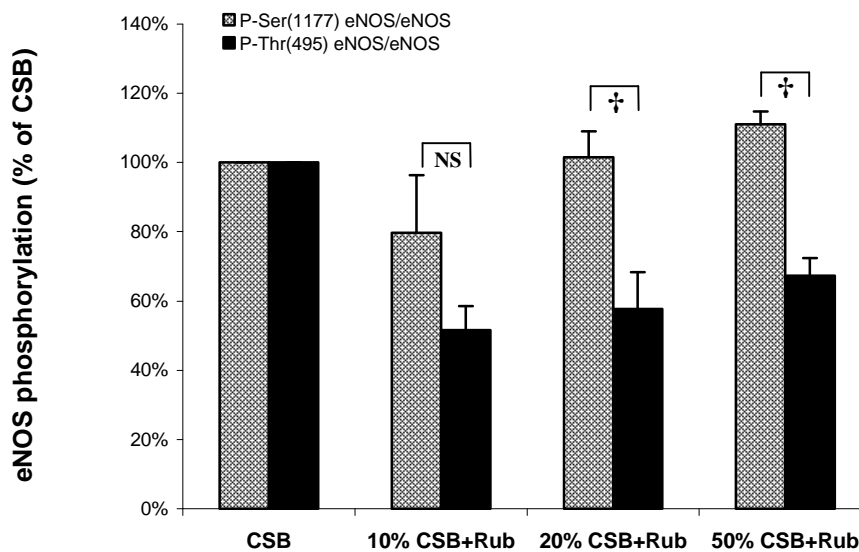
4. A dohányfüst a protein kináz B-t (mely az eNOS aktivációjáért felelős) koncentráció- és időfüggően inaktíválja. Dózis- (A panel) és időfüggést (B panel) is láttunk (\* vs. kontroll).



5. A protein kináz A útvonal gátlása (H-89) nem befolyásolta a dohányfüst hatását. A protein kináz B-t gátló szerrel (LY) az eNOS mind aktiváló, mind gátló foszforilációja növekedett. A protein kináz C részlegesen szelektív gátlása (Ro) növelte az aktiváló- és csökkentette a gátló foszforilációt, ami az eNOS aktivációját eredményezte (\* aktiváló vs. gátló foszforiláció).



6. A protein kináz C-béta specifikus gátlószer ruboxistaurin (Rub) humán vizsgálatokban javította a hiperglikémia miatti károsodott endotélium-függő vazodilatációt. Kísérletünkben a Rub növelte az aktiváló-, és csökkentette a gátló foszforilációt, ami az eNOS aktivációját eredményezte (\* aktiváló vs. gátló foszforiláció).



Eredményeink azt mutatják, hogy a cigarettafüst már korai stádiumban is kimutatható, idő- és dóziszfüggő károsodást hoz létre az endotéliumban. A dohányzás több ponton is akadályozza az NO termelését: az eNOS foszforilációt gátló irányba tolja, és megakadályozza az enzimatisan aktív dimer-állapotot.

Így különösen azokban a betegségekben, melyek eleve csökkent NO termeléssel járnak (2-es típusú cukorbetegség, magas vérnyomás, elhízás, érlemeszesedés) a dohányzás további NO csökkenést okoz, mely felgyorsíthatja az alapbetegséget, és elősegítheti a szövődmények és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulását és romlását. Eredményeink alapján a protein kináz C (különösen a C-béta) útvonal gátlása terápiás jelentőségű lehet a dohányzás-okozta káros folyamatok kivédésében, és a továbbiakban hozzásegíthet új gyógyszerek klinikai alkalmazásához.

## **2. A dohányzás inzulinrezisztenciát okoz és növeli a 2-es típusú diabetes mellitus; illetve a metabolikus szindróma kialakulásának kockázatát**

(Diabetologia Hungarica 15: 305-311, 2007)

Irodalmi összefoglalónkban az alábbiakra világítottunk rá:

- A dohányzás-okozta kardiovaszkuláris kockázatonövekedést tévesen nevezik mindössze nikotinabúzus-okozta kockázatnak.
- A dohányfüst szén-monoxid és NO tartalma közvetlenül vazodilatációt eredményezhet, és az endoteliális NO-szintáz enzimet gátló effektusa közvetve vazokonstriktiót okozhat.
- A dohányzás inzulin-rezisztenciát okoz. Ennek oka részben az inzulin anyagcserehatásainak intracelluláris jelátvivőjeként szereplő protein kinázok befolyásolása lehet.
- A dohányzás növeli a 2-es típusú diabétesz mellitusz és a metabolikus szindróma kockázatát.
- A dohányzás tartós hatása csak évekkel a dohányzás elhagyása után csökken le annyira, hogy a 2-es típusú cukorbetegség és a metabolikus szindróma fokozott kockázata megszűnjön. A szervezetnek tehát dohányzás iránti „memóriája” van.
- A dohányfüst diszlipidémiát okoz.
- A dohányzás az ép érrendszerrel rendelkezőkben - szén-monoxid és NO tartalma révén - vazodilatációt és vércukorcsökkenést, az ateroszklerotikus betegekben egyéb hatásai miatt vazokonstriktiót és vércukoremelkedést válthat ki.

## **3. A renin-angiotenzin-rendszer patogenetikai szerepe az érkárosodás kialakulásában**

(Háziorvos Továbbképző Szemle 12: 47-51, 2007)

Összefoglaló tanulmányunkban a következőkre hívtuk fel a figyelmet:

- Az inzulin metabolikus hatásának kifejlődéséhez elengedhetetlen az inzulin érzékeny szöveteket ellátó ereken jelentkező vazodilatáció, mely többek között magának az inzulinnak az értágító tulajdonságán alapul. Az angiotenzin II ezt a vazodilatációt gátolja, így inzulin rezisztenciát okoz.
- Cukorbetegségben egy ördögi kör jön létre, melyben emelkedik az angiotenzin II szint, ez inzulin rezisztenciát okoz, következményes hiperglikémiával. Az emelkedett vércukorszint az előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-product, AGE) akkumulációját eredményezi, ami visszahat a renin-angiotenzin rendszerre és fokozza az angiotenzin II képződését és hatását.
- A cukorbetegség gyakran jár együtt más betegségekkel is: a szénhidrát anyagcsere zavara, az obezitás, a hipertónia, a diszlipidémia jellemzi a metabolikus szindrómának nevezett tünetegyüttest. E betegségekben szintén a renin-angiotenzin rendszer aktivációja lép fel, és fokozott ateroszklerózis rizikóval számolhatunk.
- Az angiotenzin II továbbá vérnyomásemelkedést is okoz, és a renalis vaszkulátúra károsodásához vezet, így előidézője lehet a hipertónia vese-függő, só-érzékeny fázisának.
- A fenti tényezők károsítják a vese glomeruláris funkcióját és fokozzák a vizelet albuminürítést, melyek a kardiovaszkuláris betegségek rizikófaktorának tekintendők.
- Mindezek alapján a napjainkban terjedő metabolikus szindróma érszövődményeinek megelőzésében a gyakran igen nehezen elérhető életmódváltás propagálásán túl, a renin-angiotenzin rendszerre ható szerek alkalmazásának lehet döntő szerepe.

#### 4. Az angiotenzin II befolyásolja a Na/K ATPáz a diabéteszes patkány veséjében (J Physiol - Epub ahead of print: 2008 Sep 25)

A cukorbetegség szövődményeként kialakuló diabéteszes nefropátia a betegek 20-40%-át érinti, a felnőtt populációban a végállapotú veseelégtelenség vezető oka. Ismert, hogy a hirtelen vércukor-emelkedés a renin-angiotenzin rendszer aktiválódását okozza, valamint, hogy az emelkedett angiotenzin II szint a diabéteszes vesekárosodás további romlását eredményezi. Tudott továbbá, hogy mind a diabétesz, mind az angiotenzin II hatás befolyásolja a só- és vízháztartásban kulcsszereppel bíró Na/K ATPáz (NKA) működését, a pontos patomechanizmus azonban még ismeretlen. Élettani körülmények között az enzim proximális tubulussejtek bazális oldalán helyezkedik el és ez a lokalizáció elengedhetetlen az enzim megfelelő működéséhez.

Hirtelen, rövidtávú angiotenzin II emelkedés és cukorbetegség együttes hatását mindezidáig még nem vizsgálták, pedig a mindennapi orvosi gyakorlatban rendszeresen előforduló problémáról van szó. Mindezek alapján állatkísérletes vizsgálataink célja a diabéteszes nefropátia és az akut angiotenzin II emelkedés együttes és egymástól független hatásainak elkülönítése és a folyamat patofiziológiai hátterének feltérképezése, különös tekintettel a NKA enzim működésére.

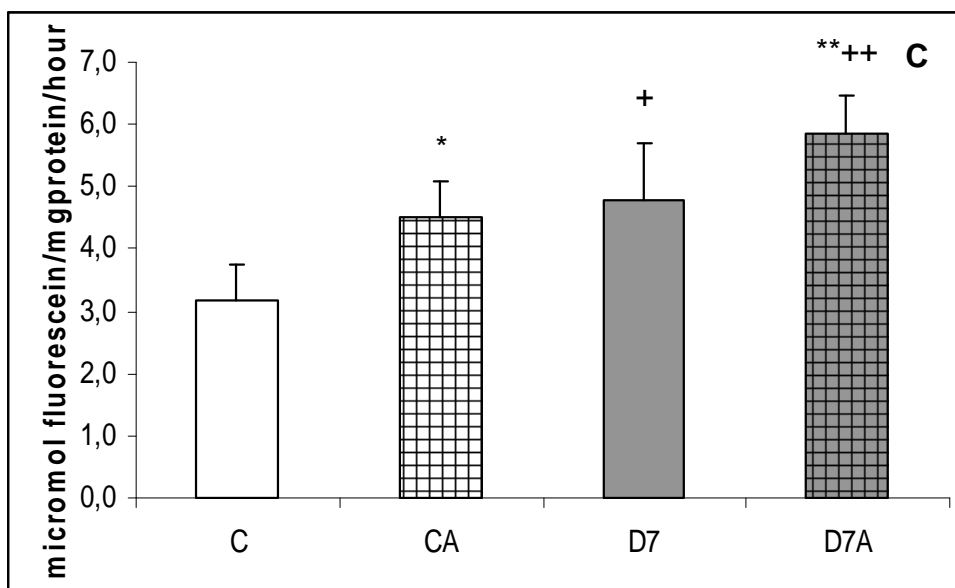
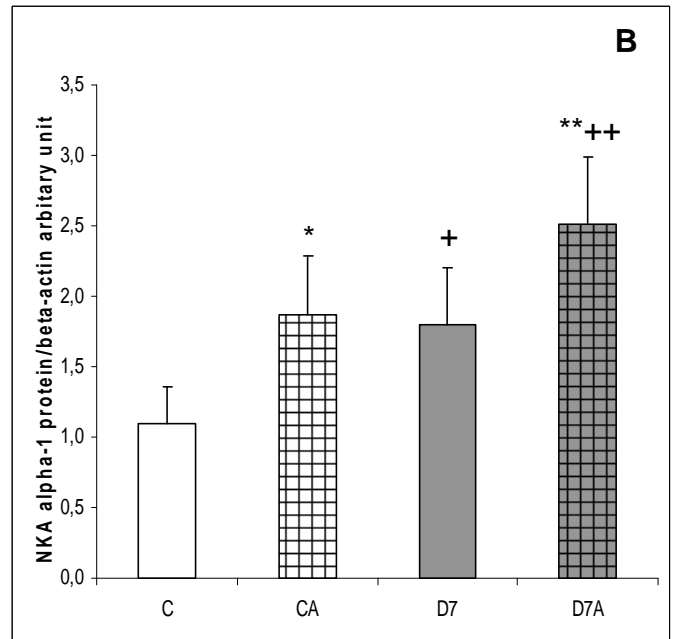
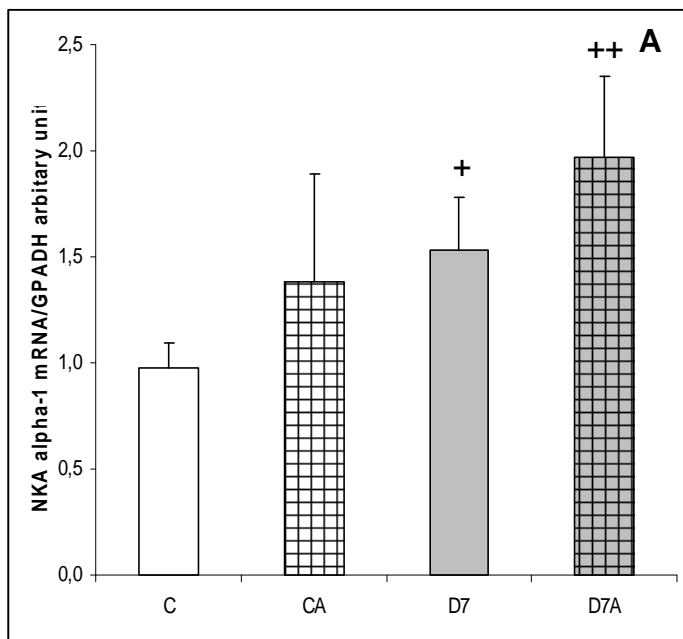
Módszerek: Kontroll (C) és streptozotocinnal indukált diabéteszes (iv. 65 mg/kg) patkányokon 7 hét elteltével (D7), 24 órán át, angiotenzin II (33ug/tskg/óra) kezelést alkalmaztunk (CA és D7A csoportok) szubkután infúziós pumpa segítségével. Az egyes csoportokban értékeltük a vesefunkció változását, a szénhidrát-anyagcsere állapotát, illetve a veseszövetből kivont NKA enzim kifejeződését, aktivitását, sejten belüli elhelyezkedését. (\* C vs. CA; \*\* D7 vs. D7A; + C vs. D7; ++ CA vs. D7A).

Eredményeink:

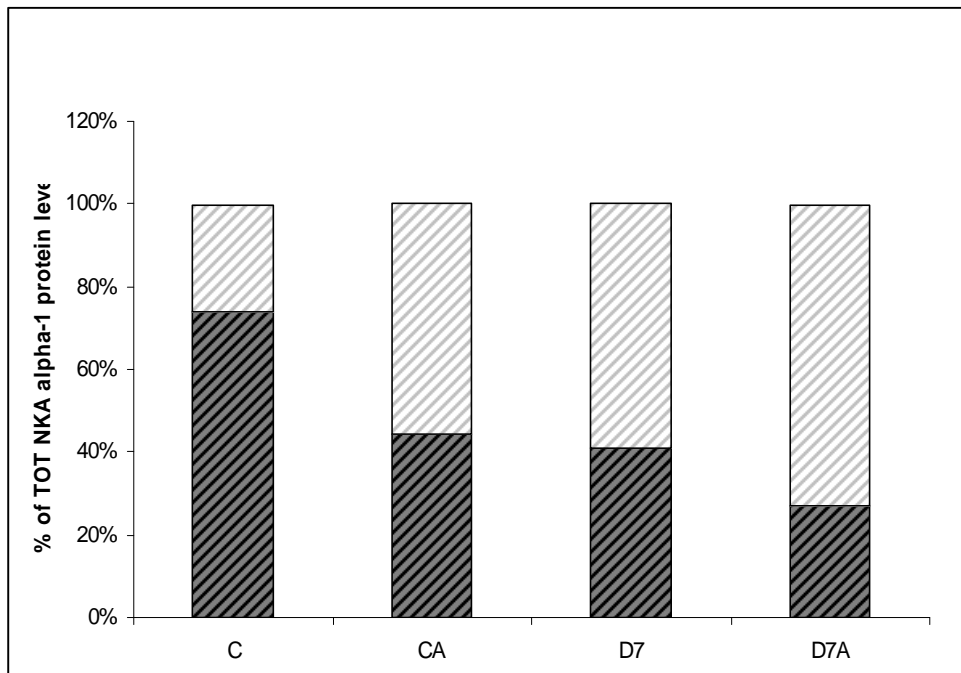
1. Az állatok laboratóriumi és általános paraméterei. Mind a diabétesz (C vs. D7), mind az ANGII kezelés (C vs. CA, D7 vs. D7A) a vesefunkció romlását eredményezte, magasabb szérumszintű kreatinin és urea nitrogén szintekkel, mely mutatja a nefropátia kialakulását.

	C	CA	D7	D7A
vércukorszint (mM/L)	8.6±1.4	8.2±1.7	<b>30.9±2.5<sup>+</sup></b>	<b>27.9±3.2<sup>++</sup></b>
fruktózamin (uM/L)	137±4	143±4	<b>252±8<sup>+</sup></b>	<b>265±32<sup>++</sup></b>
szérumszintű Na (mM/L)	149±7	142±4	145±10	143±8
szérumszintű kreatinin (uM/L)	68±5	65±2	<b>81±10<sup>+</sup></b>	<b>97±5<sup>++</sup></b>
szérumszintű karbamid nitrogén (mM/L)	4.7±0.3	<b>7.5±1.3<sup>*</sup></b>	<b>10±1.9<sup>+**</sup></b>	<b>21±3.0<sup>++</sup></b>
vizelet Na (mM/L)	69±11	55±27	<b>35±8<sup>+**</sup></b>	<b>13±1<sup>++</sup></b>
vizelet kreatinin (uM/L)	1156±231	<b>573±300<sup>*</sup></b>	<b>285±173<sup>+**</sup></b>	<b>175±96<sup>++</sup></b>
vizelet karbamid nitrogén (mM/L)	83±44	95±63	<b>69±22<sup>**</sup></b>	<b>181±26<sup>++</sup></b>
frakcionált Na exkréció (%)	2.8±0.6	<b>4.5±0.3<sup>*</sup></b>	<b>8.1±0.3<sup>+</sup></b>	<b>6.3±0.3<sup>++</sup></b>

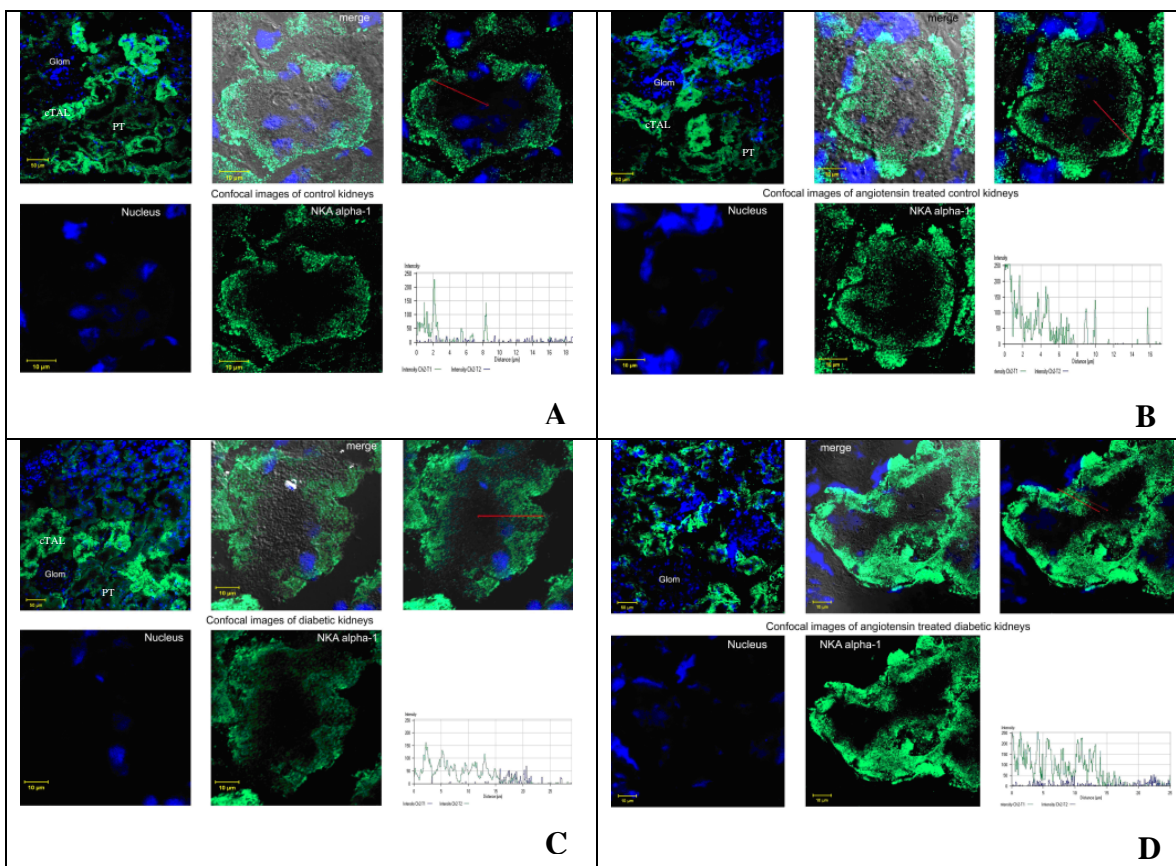
2. A vesekéreg homogenizátumában diabéteszben nőtt a NKA alfa-1 alegység (az enzim aktivitásért felelős) mRNS expressziója (A panel). Mind diabéteszben (C vs. D7), mind angiotenzin II kezelés hatására (C vs. CA, D7 vs. D7A) nőtt a NKA alfa-1 alegység fehérjemennyisége (B panel) és aktivitása (C panel). Továbbá, a diabétesz és angiotenzin II kezelés kombinációja additív hatást eredményezett (D7 vs. D7A, CA vs. D7A).



3. A vesehomogenizátumokban a NKA afa-1 alegységének detergens-szolubilis ( ▨ ) és detergens-rezisztens ( ▩ ) frakcióinak aránya. A detergens-szolubilitás a sejtmembrántól való függetlenségre utal, a detergens-rezisztencia a membránhoz kötöttséget jelenti. A NKA fiziológias működéséhez a (bazolaterális) membránhoz való kötöttség kell. A NKA foszforilációja növekedett mind a diabétesz, mind az angiotenzin II kezelés hatására a sejtplazmát reprezentáló frakcióban. Foszforilációt a sejtmembrán frakcióban egyáltalán nem mértünk, ami arra utal, hogy a NKA élettani helyéről - a bazális oldalról - a sejtplazmába került át.



4. A vesekéreg NKA alfa-1 alegységének immunfluoreszcenciás vizsgálata konfokális mikroszkóppal. Kontroll vesében (A panel) NKA alfa-1 immunpozitivitást a proximális tubulusok bazolaterális membránján láttunk. Angiotenzin II kezelés hatására ez a festődés a bazolaterális membránban a citoszol felé kiszélesedett (B panel). Diabéteszes állatokban ez a kiszélesedés jelentőssé vált, a citoszólba is nyúlt, illetve az apikális felszín irányába is terjedt a proximális tubulusokban (C panel). Diabétesz és angiotenzin II együttes hatására még kifejezettebb változás látszott: foltos festődés formájában a súlyosan sérült tubulussejtek jó részében a teljes sejtre kiterjedt a festődés, míg voltak olyan sejtek is, amelyek már nem festődtek (D panel).



Vizsgálatainkban elsőként mutattuk ki, hogy a diabétesz és az angiotenzin II kezelés vesefunkciót rontó hatása összeadódik, ún. „rárakódásos” vesekárosodást hoz létre. Mind diabétesz, mind angiotenzin II hatásra a veseműködésben központi szerepet játszó NKA kifejeződése és lokalizációja megváltozik: habár látszólag növekszik az enzim mennyisége, a NKA élettani helyéről a sejtplazmába kerül át, ami az enzimműködés gátlásához vezet. Kísérleteink szerint az angiotenzin II a fenti mechanizmuson keresztül fokozza a cukorbetegség vesekárosító hatását, ami alátámasztja az angiotenzin receptor blokkolók és az ACE gátlók alkalmazásának fontosságát a cukorbetegség kezelésének mindennapi gyakorlatában.

## **5. A dohányzás hatása a vesebetegségekre** (Magyar Belorvosi Archivum S1: 20-21, 2007)

Előadásomban hangsúlyoztam az alábbiakat:

- A dohányzás oxidatív stresszt okoz, serkenti az előrehaladott glikációs végtermékek képződését, így endotél-diszfunkciót eredményez.
- Az endotél-diszfunkció elősegíti a krónikus veseelégtelenség, a hipertónia, az ateroszklerózis és a 2-es típusú diabétesz mellitusz kialakulását és romlását, melyek szintén veseelégtelenséghez vezethetnek.
- A dohányzás vesebetegségeket rontó hatása nagyrészt az ereken és a glomerulusokon keresztül, a veseperfúzió csökkentése miatt alakul ki, azonban a tubulointerstíciumot is károsíthatja. A dohányzás egészségesekben is fokozza az albuminuriát. Rontja a vesebetegek - mind glomeruláris, mind tubuláris – proteinuriáját, csökkentheti a glomeruláris filtrációs rátát, a filtrációs frakciót.
- Különösen „nefrotoxikus” hatású a dohányzás a vesebetegségben szenvedőkben, idősokban, esszenciális hipertóniásokban. Rontja a diabéteszes nefropátiát, iszkémiás nefropátiát, IgA-nefropátiát.
- Tekintettel arra, hogy a krónikus veseelégtelenség hátterében leggyakrabban a cukorbetegség áll, a dohányzás kifejezetten káros a cukorbetegségben és vesebetegségben is szenvedőkben.

## **6. A renális anémia diabétesz mellituszban és korrekciójának jelentősége a diabéteszes nefropátia komplex kezelésében.**

(Diabetologia Hungarica 16: 51-59, 2008,

Illetve Háziorvos Továbbképző Szemle - közlésre elfogadva - 2008)

Diabetológusoknak illetve háziorvosoknak szánt összefoglalóinkban a következőket emeltük ki:

- Diabétesz mellituszban a renális anémia korábban, továbbá súlyosabban és progresszívebben jelentkezhet, mint más eredetű vesebetegségekben. Ennek fő oka az eritropoietin-termelés abszolút csökkenése, azonban szerepet játszhat az eritropoietin-rezisztencia és a funkcionális eritropoietin-hiány is.
- Az anémia növelheti a végstádiumú veseelégtelenségbe történő progresszió kockázatát, a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás, a hipertónia, a retinopátia, a neuropátia és a talpi fekélyek előfordulásának valószínűségét.
- Az anémia, a krónikus veseelégtelenség és a krónikus szívelégtelenség együttes fennállását kardio-renális-anémia szindrómának nevezik, melyek „ördögi kört” alkotva egymás kialakulását elősegíthetik. E szindróma gyakrabban és súlyosabban fordul elő diabéteszes betegekben.
- A dohányzás hozzájárul a kardio-renális-anémia szindróma kialakulásához és romlásához, mely a dohányosok morbiditásának és mortalitásának fokozódását eredményezi.



## **Dr. Wagner László további közleményei az OTKA F68638-as pályázat ideje alatt (melyek a témához NEM kapcsolódnak)**

### **Könyvfejezet:**

**Wagner L**, Wittmann I: A leggyakoribb időskori anyagcserezavarok. Egyetemi jegyzet; kórélettan; PTE; (megjelenés alatt).

### **Cikk:**

#### **Angol**

1. A Prokai, A Fekete, E Kis, GS Reusz, P Sallay, A Korner, **L Wagner**, T Tulassay, AJ Szabo: Post-transplant diabetes mellitus in children following renal transplantation. *Pediatric Transplantation*. 2008 Sep; 12: 643-9. Epub 2007 Nov 30. IF=2.1
2. Mohás M, Szigeti N, Markó L, Molnár GA, Cseh J, Laczy B, Tamaskó M, Balla J, Kappelmayer J, **Wagner L**, Wagner Z, Csiky B, Nagy J, Wittmann I: Serum Total LDH Activity and LDH-2 Isozyme in Nephrotic Syndrome. *Kidney Blood Press Res*. 2008; 31: 47-54. Epub 2008 Jan 10. IF=1.895
3. P Degrell, Z Wagner, IA Szijarto, **L Wagner**, L Marko, M Mohas, J Cseh, I Wittmann: Morphology of Glomerular Hematuria Is Reproduced in vitro by Carbonyl Stress. *Nephron Exp Nephrol*. 2008; 110:e25–e30. Epub 2008 Aug 18. IF=1.4
4. Laczy B, Cseh J, Mohás M, Markó L, Tamaskó M, Kőszegi T, Molnár GA, Wagner Z, **Wagner L**, Wittmann I: Effects of pentoxifylline and pentosan polysulphate combination therapy on diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* (2008): DOI 10.1007/s00592-008-0064-5 (közlésre elfogadva). IF=1.619

#### **Magyar**

1. Wittmann István, **Wagner László**, Markó Lajos, Tamaskó Mónika, Laczy Boglárka, Mohás Márton, Cseh Judit, Melegh Béla: A hereditaer haemochromatosis jelentősége a diabeteses betegek gondozásában. *Orv Hetil*. 2007; 148: 111-115.
2. Laczy Boglárka, Markó Lajos, Tamaskó Mónika, Cseh Judit, Kőszegi Tamás, **Wagner László**, Wagner Zoltán, Molnár Gergő Attila, Mohás Márton, Wittmann István: A pentoxifyllin és pentosan polysulphat kombinációs kezelés hatása a diabeteszes neuropathiára 2-es típusú diabetes mellitusban. *Diabetologia Hungarica* 2007; 15: 21-29.
3. Mohás Márton, Markó Lajos, Molnár Gergő Attila, Cseh Judit, Laczy Boglárka, Tamaskó Mónika, Balla József, Kappelmayer János, **Wagner László**, Wagner Zoltán, Csiky Botond, Nagy Judit, Wittmann István. A szérum LDH-aktivitás és a vese-LDH izoenzim jelentősége nephrosis szindrómában. *Magyar Belorv Arch* 2007; 62: 47-52.
4. Bekő Viktória, Mazák István, Markó Lajos, Cseh Judit, **Wagner László**, Wittmann István: A dihidralizin eritroporzisre kifejtett hatásának vizsgálata vizsgálat egy azotaemiás beteg kórtörténetében. *Hypertonia és Nephrológia* 2007; 11: 91-94.

### **Absztrakt:**

## **Angol**

1. A Fekete, A Prokai, V Muller, **L Wagner**, P Degrell, K Rusai, FN Banki, AJ Szabo: The protective role of erythropoietin (EPO) in renal ischemic reperfusion (IR) injury: gender differences

Poster: ASN 2008 Philadelphia, PA, November 4-9.

Abstract: J Am Soc Nephrol (megjelenés alatt)

2. A Fekete, A Vannay, A Prokai, V Muller, **L Wagner**, P Degrell, K Rusai, AJ Szabo: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and castration improves kidney function following ischemia/reperfusion (IR) injury: role of Na/K ATPase (NKA) and HSP72

Poster: ASN 2008 Philadelphia, PA, November 4-9.

Abstract: J Am Soc Nephrol (megjelenés alatt)