

## OTKA Zárójelentés 2006: Beszámoló

OTKA szám: 37233

### Genetikai és vasoaktív mechanizmusok, valamint az obesitás szerepének vizsgálata serdülők és adolescens korúak essentialis hypertóniájában

**Oxidatív stress juvenilis essentialis hypertóniában.** Juvenilis essentialis hypertóniában mértük az oxidatív stress azaz az antioxidáns/prooxidáns egyensúlyzavar biokémiai markereit. Az eredményeket összevetettük a testtömeg indexekkel (TTI) valamint az azonos TTI-ű kontrollokéval. A prospektív vizsgálat kezdetén a betegek (n:52) életkora  $14.4 \pm 3.1$  év, a TTI  $25.0 \pm 6.9$  kg/m<sup>2</sup>, a kontrollok (n:48) életkora  $14.3 \pm 4.3$  év, a TTI  $24.4 \pm 6.6$  kg/m<sup>2</sup> volt. Mértük a plazma nitrit+nitrát (NO), a lipidperoxidáció végtermékeiként a malonyl dialdehid (MDA), a szabad thiolok és a glutathion redox rendszer koncentrációját. A hypertóniásokban a nitrátok plazmaszintje csökkent, a lipidperoxidáció végtermékei fokozott volt. A plazma MDA/NO arány jelentősen fokozott volt a hypertóniásokban összehasonlítva az azonos TTI-ű kontrollokéval ( $p < 0.001$ ). Ez az arány jól korrelált a szisztolés és a diastolés vérnyomásokkal a teljes betegpopulációban ( $p < 0.001$ ). A hypertóniásokban a vörösvértestek szignifikáns glutathion depléciója az oxidált/redukált glutathion arány fokozódását eredményezte összehasonlítva az azonos TTI-et mutató kontrollokéval. Tehát a juvenilis essentialis hypertóniás gyermekekben és serdülőkben a TTI-től függetlenül is oxidatív stressz mutatható ki.

**Thrombocytá aggregáció, vér viszkozitás és szérum lipidek hypertóniás és obez gyermekekben.** 35 juvenilis essentialis hypertóniás gyermeket vizsgáltunk (8-17 év, medián 15.5 év). A testtömeg indexük (TTI kg/m<sup>2</sup>): 15 <25, 20 >25 volt. A 35 kontroll közül a TTI 20 esetben <25, 15 esetben >25 volt. A vizsgálat célja volt, hogy tanulmányozzuk az obesitás és a hypertónia szerepét külön-külön és együtt a thrombocytá aggregációra, a vér és a plazma viszkozításra, a plazma és a lipid koncentrációkra, a lipidperoxidációra és a nitrogén monoxid (NO) koncentrációra. Az obez gyermekekben (hypertóniás és kontroll) szignifikánsan magasabb volt az összkoleszterin és a triglicerid koncentráció. A HDL-koleszterin alacsonyabb volt az obezekben, mind a normál súlyú társaikban. A hypertenzív betegekben (obez és nem obez) a thrombocytá aggregáció fokozott, az NO szint csökkent volt, és e két érték szignifikánsan negatív korrelációt mutatott ( $r: -0.553$  és  $-0.530$ ,  $p < 0.01$ ). Mindemellett megfigyeltük, hogy az obez normotenzív betegekben a thrombocytá aggregáció fokozott. Szignifikáns pozitív korreláció volt a thrombocytá aggregáció és a TTI között ( $p < 0.01$ ). A hypertóniás gyermekekben a plazma szabad thiolok csökkentek voltak függetlenül a TTI-től. Az obez hypertóniás betegekben fokozott volt a lipidperoxidáció, a vér és a plazma

viszkozitás. A multivariancia analysis szignifikáns kapcsolatot mutatott ki az obesitás és a hyperonía, a thrombocytá aggregáció és a thiol oxidáció között. Obez gyermekekben a fokozott thrombocytá aggregáció és az oxidatív stressz részt vesz a hypertónia pathogenesisében és a vascularis károsodás kialakulásában.

### **Hemoxygenáz-1 expresszió hemodializált fiatal urémiás betegekben**

Az oxidatív stressz fontos szerepet játszik a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő (ESRD), hosszú ideje hemodializált (HD) betegek cardiovascularis szövődményeinek kialakulásában. A hemoxygenáz-1 (HO-1) gátolja a gyulladással szemben és az endotheliális károsodástól. Vizsgálatunkban tanulmányoztuk, hogy hogyan alakul a HO-1 expresszió az egyes HD kezelések után. 17 fiatal urémiás betegen közvetlenül a HD előtt és után, majd 48 órával ezt követően kompetitív reverz transzkriptáz PCR módszerrel mértük a HO-1 indukciót. Ugyancsak meghatároztuk a hemolízis indikátorainak a hemoglobinnak és a bilirubinnak a koncentráció változását, a ferroxidáz aktivitást és az oxidált glutathion szintet, mint az oxidatív stressz markerét, valamint a homocysteinnek, az atherosclerosis független rizikó faktorának a koncentrációját. A HD-program hosszától függően szignifikáns különbségek voltak a HO-1 expresszióban. A rövid ideje HD kezelt betegekben (n:7, median 19 hónap) egy fokozott HO-1 expressziót észleltünk, amely nem fokozódott a kezelés során. A régóta HD-kezelt (n:10, median 97 hónap) betegekben az alapérték csökkent. Ezekben a betegekben a HD kezelések vörösvértest károsodást és 1-5-szörös HO-1 expresszió emelkedést idéztek elő. A régi HD betegekben minden HD kezelés oxidatív stresszt is jelent a HO-1 expresszió down-regulációja mellett, amelyek hozzájárulnak a korai atherosclerosis gyorsított progressziójához.

### **Paraoxonáz polimorfizmus és oxidatív stressz obez és hypertóniás serdülőkben**

A paraoxonáz (PON1) enzim antioxidáns hatású, a plazmában a HDL-hez kapcsolódva védi az LDL-t az oxidációtól. A PON1 aktivitást és a Q192R genetikai polimorfizmus összefüggését vizsgáltuk az oxidatív stressz markerek változásával essentialis hypertóniás (EH), obezitas indukálta hypertóniás (OH) és hemodializált uraemiás (HD) betegekben életkor (C) és testsúly szerinti kontrollokhoz (OC) viszonyítva.

A hypertóniás betegek gyógyszeres kezelés előtt vettek részt a vizsgálatban, EH (n=60), OH (n=77). A HD uraemiás betegek dialízis előtti mintáit dolgoztuk fel (n=32).

A PON1 aktivitást a paraoxon hidrolízis mérésével, a QR polimorfizmust *real time PCR* módszerrel határoztuk meg. Az oxidatív stressz mértékét a lipid peroxidáció (MDA) és a NO anyagcsere végtermékeinek (NO<sub>x</sub>) koncentrációjával, a vörösvértest GSH szintekkel

jellemeztük, míg a plazma homocystein és cystein szintek az atherogenezis risk faktorai. Meghatározásuk HPLC, ill. fotometriás módszerekkel történt.

A relative oxidative stress (MDA/NO<sub>x</sub>) a legkifejezettebb a HD és OH betegkben volt. A PON1 RR genótípusa OH betegek között gyakoribb volt mint a többi betegcsoportban (6/77 vs 1/56, 2/60, 2/53, 1/32 a C, EH, OC, HD) és a PON1 aktivitás is csökkent ezekben a betegekben. Az atherogenesis risk faktora a HD betegekben volt a legmagasabb, de OH betegekben is jelentősen emelkedett, és szoros negatív korrelációt mutattak ( $r=-0.767$ ; ill.  $-0.860$ ) az NO<sub>x</sub> értékekkel.

Obezitás indukálta hypertoniás betegekben a kifejezetten emelkedett oxidatív stressz együttjárt a vasculáris megbetegedésekre hajlamosító RR genótípus gyakoribb jelenlétével, és az atherogenezis rizikó faktorainak emelkedett szintjével. Eredményeink arra is utalnak, hogy a PON1 aktivitás és polimorfizmus meghatározása a korai atherogenezis kialakulásának jelzésére alkalmas.

### **Eltérő patomechanizmus a serdülőkori essentialis és obesitas indukálta hypertoniában**

A serdülőkorúak obezitása a vascularis betegségek, így a hypertonia kialakulásának rizikófaktora. Kérdés, hogy azonos-e a patomechanizmus az essentialis és az obezitás okozta hypertonia esetén.

Vizsgálatunk célja volt az endothelium diszfunkció biokémiai jellemzése essentialis és obezitás indukálta hypertoniás serdülőkbekben.

Összehasonlítottuk az endothelin diszfunkció jeleit, a plazmában mérhető NO végtermékek koncentrációját (NO<sub>x</sub>), a relatív oxidatív stressz mértékét (MDA/NO<sub>x</sub>), az endothelin/big endothelin szinteket (End/bEnd), valamint az ACE és a xantinoxidáz (XO) aktivitás értékeket essentialis (EH, n= 20) és obezitás indukálta hypertoniás (OH, n= 31) betegek plazma mintáiban a hypertenzió kezelése előtt és 1 hónappal az ACE gátló kezelés után. Ezen adatokat életkorban megfelelő kontroll (K, n= 25) és obez (O, n=33) serdülőkbekben mért értékekkel hasonlítottuk össze. Az obezitás kialakulásában jelentős szerepet játszó leptin és leptin receptor szinteket is meghatároztuk.

A NO<sub>x</sub> értékek csökkenése a hypertoniás betegekben (EH, OH) kifejezett, de az O betegekben is mérhető, és a kezelése során nem változik. Az End szintek jelentős emelkedése csak az OH betegekben jellemző, EH esetén a bEnd szintek csökkenése figyelhető meg. Az ACE aktivitás O és EH betegekben magas, és a kezelés során csökkent, OH betegekben a XO aktivitás magas és jelentős csökkenést mutat a kezelés során. A Lept emelkedés és a Lrec jelentős csökkenése az O és az OH csoportban jellegzetes.

Az endothelin diszfunkció a különböző eredetű (EH, OH) hypertoniás betegekben egyaránt kimutatható, de az End, bEnd, ACE és XO aktivitás értékében az EH és OH betegekre jellemző eltérések vannak, ami különböző patomechanizmusra utal.

#### **A steroid dependens nephrosis szindróma levamisol kezelésével szerzett tapasztalatok**

A vizsgálat célja a gyakran recidíváló nephrosis szindrómás (NS) betegekben a levamisol terápia preventív hatásának vizsgálata volt. 60 hónapos vizsgálati periódus alatt 34 beteget (21 fiú, 13 lány) vizsgáltunk. Átlag életkoruk a diagnózis idején  $5.1 \pm 3.4$  év. A vizsgálatba vétel kritériuma a 4/12 hónap recidíva volt. A levamisolt  $2 \text{ mg/kg/nap}$  dózisban alkalmaztuk. Folyamatosan ellenőriztük a fehérvérsejt számot, a legfontosabb vizelet és vesefunkciós értékeket, a kreatinin clearance-t. A vizsgálat alóli kizárás kritériumának a  $3 \text{ G/l}$  alatti fehérvérsejt számot tekintettük, ekkor a kezelést felfüggesztettük.

A diagnózis felállításának idején a fehérjeürítés  $4.4 \pm 2.4$  gramm/nap, a kreatinin clearance  $101.51 \pm 30.8$  volt. A betegek relapszusainak száma a levamisol kezelés bevezetése előtt  $4.4 \pm 2.4$ . Az aktuális relapszust steroiddal kezeltük, majd ezt követően a steroid adását a levamisol kezeléssel egészítettük ki. A levamisol terápia elindítása előtt a proteinuria  $2.9 \pm 1.7$  gramm/nap volt, a kezelés befejeztekor  $0.14 \pm 0.21$  gramm/nap. A levamisol adása alatt  $0.32 \pm 0.46$  recidívát észleltünk 12 hónap alatt. 23 beteg egyáltalán nem recidívált, 10 betegnél 1/12 hó, 1 betegnél 2/12 hó recidíva jelentkezett. Az átlagos terápiás időtartam  $17,0 \pm 7$  hónap volt. A leghosszabb kezelés 36, a legrövidebb 5 hónapig tartott.

Az 5 esetben előforduló átmeneti leucopenián kívül egyéb mellékhatást nem észleltünk. A levamisol terápia felfüggesztése után két évvel 6 betegnél jelentkezett recidíva, 28 beteg teljes remisszióban maradt.

Eredményeink alapján a levamisol teljesen kivédte a recidívát a betegek 67.6 %-ában, 32.3%-ban pedig a kumulatív prednisolon dózist csökkent.

A levamisol tehát tapasztalataink alapján eredményesen alkalmazható a gyakran recidíváló idiopátiás nephrosis szindrómás betegek recidíva számának csökkentésében és a steroid kumulatív adagjának csökkentésében.

#### **A steroid rezisztens nephrosis szindróma cyclosporin kezelésével szerzett tapasztalatok**

A vizsgálat célja a cyclosporin kezelés hatásának felmérése volt steroid rezisztens idiopátiás nephrosis szindrómás (INS) gyermekeken. 60 hónapos periódus alatt 18 beteget (11 fiú/7 lány) vizsgáltunk, átlagéletkoruk a diagnózis idején  $9 \pm 5.4$ . Valamennyi esetben a kezdő terápia prednisolon volt, majd az ismételt relapszusok során 12/18 cyclophosphamid, 4/18 Leukeran, 4/18 azathioprin, 3/18 mycophenolate mofetil, 3/18 esetben levamisol kezelés is

történt. Ezek eredménytelensége esetén kezdtük el a cyclosporin adását 3-5 mg/kg/nap adagban.

A betegek szövettani megoszlása az alábbi volt: 6/18 FSGS, 4/18 IgM NP, 3/18 lupus NP, 3/18 MPGN, 2/18 MNP. A kezelés során a betegek éhgyomri gyógyszerszintjét 100-200 ng/ml, a csúcshintjét 800-1000 ng/ml között tartottuk. A diagnózis felállításakor a fehérjeürítés  $5.5 \pm 3.6$  g/nap volt. A cyclosporin kezelés kezdetekor a betegek átlagéletkora  $13.8 \pm 6.4$  év, a fehérjeürítés  $4.506 \pm 2.54$  g/nap, az endogén kreatinin clearance  $87.5 \pm 32.4$  volt.

A kezelés során 18 betegből 11 esetben teljes remissziót értünk el, kreatinin clearance értékük jelenleg  $90.7 \pm 43.1$ , proteinuriájuk  $0.16 \pm 0.22$  g/nap. Parciális remissziót 4 esetben észleltünk (proteinuria < 2,0 g/nap). Kreatinin clearance értékük jelenleg  $83.3 \pm 23$  fehérjeürítésük  $0.48 \pm 0.09$  g/nap. Három beteg esetében javulás nem mutatkozott, vagy betegségük progrediált. Egyikük krónikus haemodialízis programba került, egy másik peritoneális dialízist követően vesetranszplantáción esett át. A cyclosporin kezelés befejezése utáni egy évben 6 betegnek volt recidívája, 12 betegnek nem. Mellékhatásként vesefunkcióromlás, gingiva hyperplasia, hirsutismus (2/18), neurológiai eltérés (1/18) esetben jelentkezett.

Eredményeink alapján a cyclosporin terápia alkalmazásával FSGS esetén 4/6, SLE-ben 2/3, MPGN esetén 3/3, MGN esetén 2/2, IgM NP esetében 4/4 betegnél értünk el javulást. Tehát a terápia rezisztens NS eseteinkben 11/18 betegnél teljes remissziót, 5/18 esetben részleges remissziót értünk el, és a kezelés befejezése utáni egy évben 12/18 esetben a recidíva nem következett be.

### **Angiotenzinogén (ANG), angiotenzin convertáló enzim (ACE), angiotenzin II. 1 receptor (ATII1R) gén krónikus veseelégtelenségen és juvenilis essentialis hypertóniában**

18 krónikus urémiás és hypertóniás (KHY), 13 juvenilis essentialis hypertóniás beteg (JEHT) és 23 kontroll gyermek ANG, ACE és ATII1R gén polimorfizmusát vizsgáltuk. A vérnyomást ABPM monitorral regisztráltuk és mint 24 órás középnyomást értékeltük (MABP). Az utóbbi érték  $117 \pm 3.1$  volt a KHY és  $100,6 \pm 2.7$  a Hgmm volt a JEHT a szemben a kontrollokéval ( $81.4 \pm 1.9$ ). Az ANG genotípusban és az allel frekvenciában nem volt szignifikáns különbség a betegek és a kontrollok között. Az ACE génre vonatkozóan a DD genotípus szignifikánsan gyakoribb volt a KHY csoportban, mint a kontrollokban (<0.05). Az ACE ID genotípus szignifikánsan ritkábban fordult elő, mint a kontrollokban. Az ATII1R AC genotípusa szignifikánsan gyakoribb, az AA genotípus pedig szignifikánsan ritkább volt, mint a

kontrollokban ( $<0.05, < 0.05$ ). Ennek alapján úgy tűnik, hogy a magasabb szöveti és keringő ACE szinttel járó DD genotípus szerepet játszik a veseparenchyma progresszív károsodásának kialakulásában. Másrészt a az ATIII1R AC genotípusa predisponáló tényező lehet a JEHT kifejlődésében.

**A renin-aldosteron rendszer gén-polimorfizmusa primer vesico-ureteralis refluxban.** Az angiotenzinogén (ATG) gén M235T-, az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gén A1166C- és az angiotenzin II 1-es típusának (AT1) génpolimorfizmusát vizsgáltuk 77 primer vesico-ureteralis refluxban (VUR) szenvedő és 80 egészséges kontroll gyermekben. 38 VUR betegnek alacsony fokozatú (I-III.) és 39-nek magas fokozatú (IV-V.) refluxa volt. 43 betegben vese hegesedés volt kimutatható. Az ACE gén polimorfizmust polymeráz lánc reakcióval, az ATG és az AT1 gén polimorfizmust light cyclor technológiával mutattuk ki. A vesehegesedést mutató gyermekekben a DD polimorfizmus szignifikánsan gyakoribb (44%) volt, mint a kontrollokban (22,5%,  $p<0.05$ ) és a vese hegesedést nem mutató betegekben (21%,  $p<0.05$ ). A vese hegesedéssel társult VUR betegekben szignifikánsan gyakoribb volt a D allél, mint az I (D allél 0.53, I allél 0.47  $p<0.05$ ), míg a hegesedést nem mutató betegekben ez fordítva volt (D allé 0.4, I allél 0.6  $p<0.05$ ). Az ATG és az AT1 gén megoszlása nem mutatott különbséget a hegesedéssel társult és a hegesedéssel nem társult VUR csoportok között.