

Zárójelentés 2008. T48596 sz. A végstádiumú vesebetegek generalizált atherosclerosisának okai és kezelése: a hyperhomocysteinaemia és a n-3 zsírsavak szerepe című kutatási pályázatról

Tervezett kutatásainknak két fő irányvonala volt: 1. a hyperhomocysteinaemia (HHC) okai és mérséklésének (kezelésének) új lehetőségei, a nikkel, az urémiás toxinok és a homocisztein (Hcy) kapcsolatának tanulmányozása. 2. omega-3 zsírsavak (halolaj) hatása a vesebetegek lipidparamétereire, vérnyomására, a malnutritio-inflammatio paramétereire végstádiumú vesebetegekben.

1. A hyperhomocysteinaemia (HHC) a vesebetegekben nagy gyakorisággal fordul elő. A legutóbbi évekig a HHC-t a kardiovaszkuláris megbetegedések rizikófaktorának tekintettük, azonban az utóbbi évek vizsgálati eredményei azt sugallják, hogy ezt az álláspontot felül kell vizsgálni. A HHC legtöbb esetben folsav-hiányos állapotokban fordul elő, ez azonban a végstádiumú betegekben nem áll fenn, a folyamatos folsav szupplementáció miatt. Ugyanakkor a HHC-ban megnő az S-adenozil-homocisztein (SAH) mennyisége, a SAH pedig gátolja a metiltranszferázok aktivitását, ez pl. a DNS hipometilációjához vezethet, amely a tumorszupresszor gének down-regulációját okozhatja, így hozzájárulhat a daganatos megbetegedések kialakulásához.

Állatkísérletes adatok szerint a HHC nikkel, kobalt, réz és vas só adásával is mérsékelhető, legnagyobb mértékű hatása a nikkel sónak volt. Humán adatok azonban a nikkel és homocisztein szintek közti kapcsolatra nem ismertek. Vizsgálataink célja ezért a nikkel homocisztein (Hcy) termelést befolyásoló képességének *in vivo* és *in vitro* vizsgálata volt. Első lépésben hemodialízis programban kezelt (HD) vesebetegekben, meghatároztuk a laborparaméterek mellett, a homocisztein, folsav, B₁₂-vitamin, kobalt, nikkel, réz és vas szinteket, majd *in vitro* kísérletekben frissen izolált humán perifériás mononukleáris (PBMC) sejteken vizsgáltuk a nikkel és az egyéb nyomelemek homocisztein termelésre kifejtett hatását.

A HD betegeket Hcy szerint csoportosítva nem találtunk különbséget a kobalt, réz és totál protein szintekben, míg a nikkel magasabb, a folsav és a vas alacsonyabb volt az alacsony Hcy szintű betegekben. A regressziós analízis eredménye szerint, a Hcy negatív korrelációt mutatott a folsav ($r=-0.302$, $p<0.006$), a B₁₂-vitamin ($r=-0.347$, $p<0.0001$), a nikkel ($r=-0.289$, $p<0.006$) és a CRP ($r=-0.230$, $p<0.02$) szintekkel. Pozitív korrelációt találtunk a Hcy, a szérum albumin ($r=0.316$, $p<0.0004$) és a hemoglobin ($r=0.329$, $p<0.0001$) értéke között. Nem volt kapcsolat a Hcy és a kobalt, a réz, a vas koncentrációk, vagy egyéb laboratóriumi paraméterek között. Egészséges egyéneknél a Hcy és nikkel között ugyancsak kapcsolat van, azonban ez nem szignifikáns ($r=-0.178$).

In vitro kísérletekben igazoltuk, hogy nikkel a HD betegekben talált koncentráció-tartományban (<25 µg/L) nem citotoxikus, nem befolyásolja a PBMC-k életképességét, proliferációját, Fas-ligand és TRAIL termelését, nem indukál apoptózist. A nikkel azonban már egész kis koncentrációknál (1 µg/L) szignifikáns mértékben gátolja (~50 %) a PBMC-k intracelluláris homocisztein koncentrációját. A nikkel koncentrációjának emelése (100 µg/L) csökkentette a gátló képességet, feltehetőleg már enyhe citotoxikus hatás következtében. A nikkel intracelluláris Hcy koncentráció csökkentő hatását, a Hcy irreverzibilis metabolizációja során keletkező cisztein nem befolyásolja, míg glutation kivédi azt. A metionin kör enzimej közül a SAH-hidroláz (SAHH) aktivitását a nikkel fokozza, míg a metionin szintáz aktivitását, amely a homocisztein metioninná történő remetilációját végzi, a gátolja. Ez utóbbi esetben már 1 µg/L nikkel 50 %-os gátlást okozott és koncentrációjának növelése nem

változtatott a gátló képességen. A nikkell intracelluláris ROS termelést indukál, melynek a redox szenzitív gének aktivációjában (pl. NF- κ B) lehet szerepe. HepG sejteken is elvégeztük a kísérleteket és a PBMC-kel azonos eredményre jutottunk, azaz a nikkell 1-25 $\mu\text{g/L}$ koncentráció tartományban csökkenti a sejtek Hcy tartalmát. A felülszók Hcy tartalmát is meghatároztuk annak eldöntésére, hogy az intracelluláris Hcy csökkenés nem a fokozott kiáramlásnak tulajdonítható-e. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy az extracelluláris folyadékban is csökken a Hcy tartalom. További kísérleteinkben a nikkell transzmetilázok aktivitására kifejtett hatását vizsgáltuk C^{14} -jelzett metionin segítségével. A kapott eredmények ellentmondásosak voltak, néhány esetben a DNS és a fehérje frakciókban emelkedett a C^{14} -aktivitás, más esetekben nem változott vagy csökkent. Így a transzmetilázokra kifejtett hatás vizsgálatát még jelenleg is folytatjuk, hiszen a hatásmechanizmus megértését ezek az eredmények segíthetik.

Az urémiás toxinok közül legnagyobb koncentrációban az urea akkumulálódik a szervezetben. Hatását megvizsgáltuk a PBMC-k intracelluláris Hcy koncentrációjára. Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy az urea 20 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációtól kezdve szignifikáns mértékben (~50 %) csökkentette az intracelluláris Hcy koncentrációt, hatása az urea növelésével nem változott. Nikkellel együtt adva további változást nem tapasztaltunk. Urea jelenlétében a SAHH aktivitás kismértékben nőtt (0.115 vs. 0.103 mU/mg protein), míg a metionin szintáz aktivitása nem változott. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a vesebetegekben akkumulálódott urea, legalábbis in vitro körülmények között, nem okoz Hcy termelés fokozódást, azaz az urémiás betegekben gyakori HHC nem ennek az urémiás toxinnak tulajdonítható.

Megvizsgáltuk még, az állatkísérletekben ugyancsak hatásos Hcy csökkentő kobalt, réz, és vas hatását is humán PBMC-ben és HepG sejtekben. Megállapítottuk, hogy az intra- és extracelluláris Hcy szinteket csak a nikkell csökkentette, a vasnak és kobaltnak nem volt szignifikáns hatása, míg a réz szignifikáns mértékben emelte az intracelluláris és csökkentette az extracelluláris Hcy tartalmát. A vas és kobalt esetében az intra- és extracelluláris glutation koncentráció jelentős mértékű emelkedését figyeltük meg. Ezek az eredmények jelzik, hogy az egyes nyomelemek különböző módon hatnak a metionin-homocisztein kör működésére.

Összefoglalva, eredményeink szerint a nikkell, az állatkísérletekben bizonyított módon, humán vonatkozásban is szerepet játszik a metionin-kör működésében, részt vesz a homocisztein termelés szabályozásában.

Végül, öt évre visszamenően összegyűjtöttük betegeink totál homocisztein értékeit és vizsgáltuk a daganatos és az érrendszeri megbetegedések előfordulását, a Hcy függvényében. Azt találtuk, hogy mindkét típusú megbetegedés legnagyobb gyakorisággal az alacsony ($\text{Hcy} < 10 \mu\text{mol/L}$) illetve a magas ($\text{Hcy} > 25 \mu\text{mol/L}$) homocisztein szintű betegek körében fordult elő. Ennek alapján felvethető, hogy a HD betegek Hcy értékeinek 25 $\mu\text{mol/L}$ alá történő csökkentése nem szükséges.

Eddigi eredményeinkről több konferencián beszámoltunk, egy közlemény megjelent, egy összeállítás folyamatban van. Az MSzKT III. Kongresszusán (Pécs, 2007. okt. 11-13.) és az MSzKT és MTA Mikroelem Munkabizottság Tudományos Ülésén (Budapest, 2008. szeptember 26.) e témakörben bemutatott eredményeinkkel első díjat nyertünk.

2. Az omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak hatásának vizsgálata végstádiumú vesebetegekben: A végstádiumú vesebetegekben a kardiovaszkuláris mortalitás nagy százalékban való előfordulásához hozzájárul, hogy alacsony estükben az omega-3 zsírsavak bevitele. Több primer (US Physicians Health Study, US Nurses Health' Study) és szekunder (Diet and Reinfarction Trial (DART), Lyon Heart Study, GISSI Preventional Study) prevenciós tanulmány eredménye bizonyította az elmúlt két évtizedben, hogy az omega-3 zsírsavak védenek a hirtelen szívhalál és az acut myocardialis infarctus (AMI) kialakulásával szemben. A vizsgálatok alapján az American Heart Association, és ennek alapján a II. Magyar Terápiás Konszenzus Konferencia a napi 1 g omega-3 zsírsav fogyasztását ajánlja kardioprotektív hatásuk miatt.

Az omega-3 zsírsavak hatásait krónikus vesebetegekben több tanulmány is vizsgálta, azonban többségükben mega-dózisú omega-3 zsírsavat kaptak a betegek (2-6 g/nap), a kezelési idő pedig rövid volt (8-12 hét, maximum 6 hónap). A tanulmányok közös megállapítása az, hogy az omega-3 zsírsav adása során melléktünet nem lépett fel, és kedvező irányban változtak a lipid értékek, csökkent a szérum TG koncentráció, szignifikáns mértékben lassult a vesefunkció romlása, nem fokozódott az oxidatív stressz.

Jelen vizsgálatban célunk az AHA ajánlotta (napi ~1 g) omega-3 zsírsav 10 hónapig történő adása volt, melynek során az általános laboratóriumi paramétereket havonta, egyéb paramétereket a vizsgálat indításakor, 6 és 10 hónap múlva határoztuk meg. A vizsgálatokat nem szupplementált kontrollok eredményeivel vetettük össze. Mértük az adipocitokineket (leptin, rezisztin, adiponektin), oxidatív stressz (ox-LDL-t, plazma TBARs), az endotél diszfunkció jellemzőit (sICAM, sVCAM, sE-selectin), eikozanoidokat (TXB2, PGE2, LTB4), vazoaktív anyagokat (ET-1, nitrogén monoxid, cGMP), proinflammatorikus citokineket (IL-6, TNF-alfa) mindkét betegcsoportban. Összességében azt állapítottuk meg, hogy az American Health Association és a II. Magyar Terápiás Konszenzus Konferencia ajánlása szerinti napi 1 g omega-3 zsírsav adása ebben a nagy kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező betegcsoportban is több előnyös hatást fejtett ki. Bár az összmortalitás nem különbözött a kontroll HD csoporthoz képest, azonban a kezelés 10 hónapja alatt, AMI egyetlen szupplementált beteg esetében sem alakult ki, míg a kontrollok között két fatális AMI történt. Az első analízisek eredményei arra hívták fel figyelmünket, hogy az alultáplált betegek adatait külön is kiértékeljük. Megállapítottuk, hogy az omega-3 szupplementáció következtében a malnutritio mértéke jelentősen csökkent, amit a szérum albumin szintek és a száraz testsúly növekedése mutatott. Ugyanakkor a CRP, IL-6 és TNF-alfa szignifikáns csökkenését is tapasztaltuk. A tíz-paraméteres malnutritio-inflammatio score (MIS) az egyik olyan módszer, amelyet a malnutritio-inflammation-atherosclerosis (MIA) szindróma objektív megítélésére használnak az irodalomban. Meghatároztuk ezeket az értékeket a szupplementált és kontroll HD betegek esetében a vizsgálat elindításakor, 6 és 10 hónap múlva. A kezdeti MIS átlagban nem volt különbség a két csoport között. A kontrollokban az összesített MIS romló tendenciát mutatott (5.1, 6.67 és 7.41) míg az omega-3 szupplementált betegekben nem változott (4.89, 4.8 és 4.17). Az alultáplált egyénekben a szupplementáció megakadályozta a MIS csökkenését (7.26, 5.26 és 4.66), ami a kontrollokban jelentős mértékű romlást mutatott (6.85, 8.64 és 10.06). Tekintettel arra, hogy a malnutritio-inflammatio fontos prediktora a HD betegek mortalitásának és életminőségének, az omega-3 zsírsav malnutritiot és inflammatot csökkentő hatása fontos új megállapítás. További új megfigyelés, hogy az omega-3 zsírsav szupplementáció kedvezően befolyásolta az *endotél károsodás* markereit (sICAM, sVCAM és sE-selectin), azaz megakadályozta

emelkedésüket, ami a kontroll betegekben volt megfigyelhető, szignifikáns mértékben csökkentette az *eikozanoidok* koncentrációját – a TXB2 (463±304 vs. 857±458 pg/ml, p<0.04) az LTB4 (686±783 vs. 1202±804 pg/ml, p<0.02) és kisebb mértékben a PGE2 (851±208 vs. 1077±322 pg/ml) – és a vérnyomás csökkentéssel együtt a *vazoaktív* anyagok (NO, cGMP) mennyiségét, nem változott azonban az ET-1, a leptin, a rezisztin és az adiponektin koncentrációja. Ez utóbbi alapján megállapítható, hogy az étvágy javulásában - és ennek következtében a testsúly növekedésében - az inflammatio csökkenése lehet a meghatározó folyamat. Több paraméteres korrelációs analízis eredménye is ezt támasztja alá. Az eredmények szerint az omega-3 zsírsav bevitel és a szérum albumin (r=0.321), a TG szintek (r=-0.273), a CRP (r=-0.268), az IL-6 (r=-0.198) és a TNF-alfa (r=-0.149) között szignifikáns kapcsolat mutatható ki. Összességében megállapíthatjuk, hogy a tíz hónapos omega-3 zsírsav szupplementációt a betegek nagy többsége jól tolerálta, előnyös hatások minden betegekben megfigyelhetők, azonban az alultáplált HD betegekben sokkal kifejezettebbek a változások. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy ez a dózis (1 g/nap omega-3 zsírsav) költség-hatékony módszer lehet a HD betegek kardiovaszkuláris mortalitásának csökkentése szempontjából.

Eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián mutattuk be. Az eredmények összegzéséről egy közleményt most küldünk be az NDT-be, egy másik írása folyamatban van.