

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Az angiotenzin-konvertáló enzim
I/D polymorphismusának szerepe vesétültetést követően a graft és a
recipiens hosszútávú túlélésében

Dr. Fedor Roland

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2014.

**Az angiotenzin-konvertáló enzim
I/D polymorphismusának szerepe veseátültetést követően
a grafit és a recipiens hosszútávú túlélésében**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Fedor Roland, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok:	Dr. Balogh István, PhD Dr. Rempert Ádám, PhD

A doktori szigorlat helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekklinika
Könyvtára, 2014. november 3., 11 óra.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Takács László, akadémikus
Dr. Szederkényi Edit, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok:	Prof. Dr. Takács László, akadémikus Dr. Balogh István, PhD Dr. Rempert Ádám, PhD Dr. Szederkényi Edit, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” Épület tanterme, 2014. november 3., 13 óra.

Bevezetés

A végstádiumú vesebetegség (ESRD) incidenciája világszerte évről évre emelkedik. Az évente elvégzett veseátültetések száma, az ún. transzplantációs aktivitás azonban stagnál. Jól ismert tény, hogy a végstádiumú vesebetegségben szenvedők kezelésében a veseátültetés hosszabb túlélést biztosít, mint a vesepótló kezelések bármely formája. A transzplantációt követően várható túlélés azonban így is rövidebb, mint a nem vesebeteg populáció esetében. Ennek fő oka a magasabb szív-érrendszeri eredetű halálozás. Transzplantációt követően a kardiovaszkuláris események kockázata ötvenszerese a normál populációénak. A kardiovaszkuláris betegségek hátterében olyan etiológiai tényezők állhatnak, mint kövéréség, az elsődleges vesebetegség, az átültetett szerv minősége, későn induló graftfunkció, heveny kilökődés, a calcineurin inhibitor típusú gyógyszerekkel történő immunszuppresszív kezelés, az alkalmazott glükokortikoidok mellékhatásai, a beültetett vese artéria renalisának stenosisa és idült allograft károsodás (krónikus allograft nephropathia, CAN). Nem meglepő tehát, hogy például a magas vérnyomás a recipiensek 75-90%-át érinti.

A veseátültetés végstádiumú vesebetegek számára az életminőség jelentős javulásával járó therapiás alternatíva. Az immunszuppresszív kezelés hatásossága és biztonságossága szinte töretlenül fejlődött az elmúlt évtizedekben. Míg korábban a legnagyobb veszélyt a graft elvesztésére az akut kilökődés jelentette, napjainkban a beültetett vesék legnagyobb arányban CAN miatt válnak működésképtelenné.

A beültetett vese idült károsodását klinikailag a veseműködés beszűkülése, a salakanyagszint emelkedése, proteinuria, hipertenzió jellemzi. A biopsziával nyert minta szövettani feldolgozását követően a hisztológiai leleten interstitialis fibrosist, a veseerek hyalinos megvastagodását, tubulusatrophiát láthatunk. Ez a kórkép, hasonlóan a kardiovaszkuláris betegségekhez, több okra is visszavezethető. Az ismert etiológiai faktorokat immunológiai és non-

immunológiai csoportra osztja az irodalom. Immunológiai ok a donor és a recipiens HLA antigénjei közötti eltérés, az átültetést követő kilökődési reakciók előfordulása, de fokozza a CAN kialakulásának rizikóját a recipiens magas panel reaktív antigén szintje is. Az úgynevezett nem immunológiai okok között az ischaemias-reperfusios károsodás, a recurráló vesebetegség, a magas vérnyomás, a hyperlipidaemia, a gyógyszertoxicitás és egyes infekciók szerepelnek.

A renin-angiotenzin rendszerben közreműködő gének polymorphismusainak szerepét mind a kardiovaszkuláris szövődményekkel, mind a CAN-al kapcsolatba hozták az utóbbi évek klinikai és kísérletes kutatásai. Az eredmények azonban sokszor ellentmondásosak. Az eltérő beteganyag, változó betegszámmal és különböző kiválasztási kritériumok alapján elvégzett vizsgálatok következtetései nem egybehangzóak, így nem alakulhatott ki egyértelmű állásfoglalás ezen gének, illetve ezen gének polymorphismusainak lehetséges szerepéről.

A renin-angiotenzin rendszer (RAS)

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer a só-, vízháztartás és a szervezet homeostasisának egyik alapvető szabályozója. Meghatározó szerepet tölt be mind a rövid-, mind a hosszútávú vérnyomás-szabályozásban. Befolyása van a testnedvek térfogatának szabályozásán keresztül a rezisztenciaerek tónusára, de a folyadék felvételre, valamint az elektrolit forgalomra is. A RAS egy olyan szabályozó rendszer, mely részt vesz a vese keringésén keresztül, valamint közvetlenül is a nátrium kiválasztás szabályozásában.

A RAS működésében kezdetben – mint a renin név is utal rá – a vese központi szerepét feltételezték. Skeggs és munkatársai 1957-ben közölték a többlépcsős folyamatot, mely során az angiotenzinogénből előbb angiotenzin-I (Ang-I), majd angiotenzin-II (Ang-II) jön létre. Az angiotenzinogén egy 453 aminosav hosszúságú fehérje, amelynek első 10 aminosavát a renin lehasítja, így

képződik az Ang-I. Ezt az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hasítja tovább az aktív érösszehúzódsáért felelős oktapeptidre, az Ang-II-re.

Az 1970-es években megkezdődött a RAS specifikus inhibitorainak felfedezése is, melyek hamarosan bekerültek a mindennapi gyógyítás eszköztárába is.

Angiotenzin-konvertáló enzim (ACE)

Az ACE membránokhoz kötött a sejtek felszínén és a sejteken belül egyaránt előfordul. Megtalálható az artériák és vénák endothelsejtjein, az epithelialis sejteken, a kardiovaszkuláris rendszerben, az agyban, a reprodukációs szervekben, de a fibroblasztokon és macrophagokban is. Szolubilis formában jelen van a plazmában, de valamennyi testfolyadékban kimutatható. Szubsztrátkötéséhez és működéséhez klorid- és cinkionokra van szükség. Szubsztrátspecificitása igen alacsony, számos anyagból hasít di-, vagy tripeptidet. Az ACE két enzimatikusan aktív centrummal bír. Mindkét helyen hatékonyan bontja az enzim a bradikinint, azonban az Ang-I-et a C-doménon lévő hasítja effektívebben. Az ACE a kallikrein hatására kininogénből felszabaduló, vazodilatátor hatású bradikinint és kallidint is hasítja, s ezzel inaktíválja.

Angiotenzin-II (Ang-II)

Az Ang-I csak kis mértékben befolyásolja a vérnyomást, míg az Ang-II a szervezet egyik leghatékonyabb vazokonstriktor hatású molekulája. Az Ang-II vaszkuláris simaizmon található receptorához (angiotensin II 1-es típusú receptor, AT1R) kötődve másodperceken belül összehúzódsást hoz létre az arteriolákon, ezzel növelve a perifériás ellenállást és fokozva a vérnyomást. Direkt érszűkítő hatást fejt ki főleg a prekapilláris arteriolás szakaszon és kevésbé a posztkapilláris vénákon. A vazokonstriktor hatás a legjelentősebb a vesében, a splanchnikus érpályán, gyengébb az agyban, elhanyagolható a tüdőben és a harántcsikolt

izomzatban. A gyors vérnyomásemelő hatásánál fontosabb a szerepe a vérnyomás hosszútávú megemelésében és stabilizálásában. Ezen hatása a vesén keresztül létrejövő többirányú mechanizmus következménye.

Jelentős hosszú távú hatása inkább proliferatív, mint szabályozó jellegű. Morfológiai változást, átépülést okoz a kardiovaszkuláris rendszer szerkezetében. Fokozza az erek falában és a szív izomzatában a fibrosis kialakulását és ezen irányú folyamat előrehaladását. A specifikus protoonkogének, a növekedési faktorok működésének serkentésével az érsimaizom, a szívizomsejtek, a fibroblastok migrációját, proliferációját, hipertrófiáját okozza. Ezzel jelentős szerepe van az úgynevezett célszervkárosodásban. Feltételezik, hogy kötőszöveti proliferációt fokozó hatása nem korlátozódik a kardiovaszkuláris rendszerre, hanem a vesében kialakuló fibrotikus elváltozásokért is végső soron az Ang-II tehető felelőssé.

Angiotenzin-II receptorok altípusai

Az Ang-II G-féhréjékhez kapcsolt receptorokon fejti ki hatásait, melyek közül eddig legbővebben az 1-es és a 2-es típusú Ang-II receptorokat (AT1R és AT2R) jellemezték. Angiotenzin II receptor expressziót kimutattak ér simaizomsejtekben, mellékvesekéregben, vesében, szívizomban, agyban, mellékvesevelőben, májban, uterusban, hypophysisben és a gonadokban is. Az AT1R serkentése számos jelátviteli rendszeren keresztül fejtheti ki az effektor sejtekre jellemző hatást. Az AT1R-ok fokozzák a protoonkogének működését, ezáltal elősegítve a sejtnövekedést, különösen a szív izomsejtjeinek és az erek simaizomsejtjeinek esetében.

A 2-es típusú receptor szerepe és funkciója nem ilyen egyértelmű. Szerepe a vaszkuláris remodelingben az AT1R hatásaival ellentétes, így a sejtnövekedést és differenciálódást gátolja. Az ezen receptoron keresztül ható folyamatok szerepet

kapnak az extracelluláris mátrix (ECM) modulációjában, a neuronok regenerációjában, az apoptózisban, a vasodilatációban.

A 3-as és 4-es típusú angiotenzin-II receptorok szerepe még nem tisztázott. Az AT4R-ről tudott annyi, hogy az angiotenzin-IV – az Ang-II metabolitja – aktiválja és a központi idegrendszer ECM-nak regulációjában lehet szerepe, amit az oxitocin felszabadulásán keresztül fejt ki.

Polymorphismus

A polymorphismus a DNS olyan változata, mely az adott populációban legalább 1%-os gyakorisággal fordul elő. Ezek a módosulatok jelenthetik a DNS molekulán belül hosszabb-rövidebb nukleotid-szekvencia beékelődését, vagy kiesését (inzerció/delécio), egyetlen nukleotid kicserélődését, vagy egy nukleotid-szekvencia különböző számú, egymás utáni ismétlődését. A DNS molekula ezen változatai hatással lehetnek a génről átíródó fehérje mennyiségére, aktivitására. Mindezek által egyes génpolymorphismusok szerepet játszhatnak patológiás folyamatok iniciálásában és progressziójában.

Az ACE gén inzerciós/delécio (I/D) polymorphismusát Rigat és munkatársai részletezték először 1990-ben. Vizsgálatukban 80 egészséges egyénben találtak eltérő keringő plazma ACE-koncentrációt, mely variabilitás okaként egy 287 bázispár hosszúságú génszakasz meglétét, vagy éppen hiányát írták le. Az II genotípusúaknál volt az enzim mennyisége a legalacsonyabb, míg a delécio homozigóta DD egyéneknél a legmagasabb.

Chronicus allograft nephropathia (CAN)

Az idült allograft károsodás a veseátültetés eredményeit legsúlyosabban befolyásoló tényező. A folyamat klinikai szemszögből teljesen tünetmentesen, észrevétlenül kezdődik és kialakulása, súlyossági foka egyértelmű összefüggést mutat a graft túlélésével. A mai napig folyik a lehetséges rizikótényezők

felkutatása, bár már meglehetősen sok kórokozót azonosítottak. Ezeket immunológiai és non-immunológiai csoportra osztják. Immunológiai etiológiai faktor a HLA-mismatch, az akut rejekciók száma és azok súlyossági foka, a recipiens PRA szintje, a donor-specifikus antitestek (DSA) megléte és titere, valamint az alkalmazott immunszuppresszív kezelés. Nem immunológiai kóroki tényező lehet a donor életkora, neme, a donáció típusa (cadaver, vagy élő), az agyhalál oka, a donor esetleges magas vérnyomása és vesefunkciója. Befolyásolja kialakulását a későn induló graftfunkció (DGF), a hideg ischaemias idő hossza (CIT), a recipiens és a vese mérete, diabetes mellitus megléte, vagy kialakulása, valamint a recipiens atherosclerosis és minden ahhoz vezető lehetséges ok.

A szövettani feldolgozás során a vese és a nephronok minden alkotóelemén megfigyelhető degeneratív, vagy éppen fibroticus elváltozás. Az interstitiumban fibrocyták szaporodnak fel és erőteljes fibrosis figyelhető meg, a tubulusok atrophizálódnak, a glomerulusok sclerioticusak, míg az arteriolák falában fokozott hyalinlerakódás, stenosis észlelhető. Ezen elváltozások összességében a graft működésének fokozatos és visszafordíthatatlan károsodását okozzák, míg végső soron a teljes veseműködés leáll és a beteg ismét vesepótló kezelésre szorul.

Bal kamrai hypertrophia

A veseátültetésen átesett betegek túlélését az immunszuppressziós kezelés szövödményeként fellépő fertőzések mellett, hosszú távon a kardiovaszkuláris betegségek befolyásolják a legkedvezőtlenebb mértékben. A transzplantált betegek késői halálzásának legfőbb oka a szív-érrendszeri megbetegedés. A már jól ismert rizikófaktorok is mind előfordulhatnak ezen betegcsoportnál és fokozzák a kedvezőtlen kimenetel valószínűségét. A magas vérnyomás a recipiensek 75-90%-át érinti. A systolés vérnyomás 1 Hgmm-rel való tartós emelkedése a kardiovaszkuláris események bekövetkeztének valószínűségét 1-2%-al emeli meg.

Már 130/85 Hgmm-es értéknél magasabb vérnyomás esetén is gyakoribbá válik a jelentős rizikótényezőként elismert bal kamrai hypertrophia (LVH) kialakulása.

Az LVH diagnózisa EKG és szív-ultrahang vizsgálaton alapszik és kialakulásában a magas vérnyomás mellett olyan rizikótényezők szerepelnek, mint csökkent vesefunkció, vérszegénység és genetikai tényezők. A renalis parenchyma csökkent funkciója mind a folyadékterhelés fokozásán keresztül, mind a RAS fokozott aktiválódásával hozzájárul a szív megváltozott morfológiájához és így a csökkent funkciójához. A folyamat a szív teljesítőképességének romlását eredményezi. A keringő RAS mellett a szöveti RAS-aktivitása is fokozódik. A különböző szövetekben (myocardium, érfal) termelődő Ang-II fokozza az apoptózist, a myocyták hypertrophiáját és interstitialis fibrosist indukál, mellyel a szívelégtelenség további progresszióját eredményezi.

RAS-gátló kezelések

Az ACE-gátlók a hypertónia szinte minden formájában alkalmazható szerek. Gátolják az ACE-t a plazmában és a szövetekben egyaránt, ennek eredményeként az Ang-II koncentrációja csökken, míg a bradikinin-szint nő. Ennek következtében mérséklődik a perifériás erek ellenállása s csökken a systemás vérnyomás. Javítják a károsodott endothel-funkciókat és gátolják a hypertóniás ér- és myocardiális elváltozások kifejlődését. Előrehaladott vesekárosodás esetén a proteinuria csökkenését és a vesefunkció romlásának késleltetését, sőt néhány vizsgálatban annak kismértékű javulását, illetve a progresszió lassulását tapasztalták ACE-gátlók alkalmazásakor.

Az angiotensin-II receptor-antagonisták (ARB) nephroprotektív hatását számos vizsgálat bebizonyította, emellett anti-atheroscleroticus hatásuk is jól dokumentált. Figyelemre méltó, hogy kevés a mellékhatásuk és a hypertonia minden fajtájában (kivéve a terhességi magas vérnyomás és a kétoldali arteria

renalis stenosis) alkalmazhatók. Hatékonyságuk renovaszkuláris hipertóniában fokozott.

A direkt renin-inhibitorok (DRI) a reninhez kapcsolódva gátolják az angiotenzinogén kötődését, így az Ang-I képződését a plazmában és a szövetekben is. A klinikai gyakorlatban csupán egyetlen ilyen készítmény érhető el jelenleg. Az aliskiren igen hatékonyan csökkenti a vérnyomást. Mérsékelte a balkamra-hypertrophiát, s kedvező hatású volt szívelégtelenségben is az első tanulmányok szerint. Ennek ellenére a frissebb (ALTITUDE) vizsgálatot a tervezettnél hamarabb le kellett állítani biztonsági okok miatt és a kedvező hatások elmaradására hivatkozva, ami kétségeket vet fel az aliskiren klinikai alkalmazhatóságát tekintve.

Célkitűzések

Munkánk során célunk volt egy vérből meghatározható biomarker azonosítása, mellyel a beültetett vese hosszútávú túlélése egyértelmű összefüggést mutat.

1. Célunk volt vizsgálni az ACE gén I/D polymorphismusának szerepét a graft hosszútávú túlélésében.
2. Vizsgáltuk az ACE gén említett polymorphismusának és a bal kamra hypertrophiájának összefüggéseit, azzal a céllal, hogy kapcsolatot mutassunk ki a genetikai módosulat és a betegek kardiovaszkuláris rizikója között.
3. Összességében egy olyan jól definiálható, non-invazív úton meghatározható, fájdalommentesen, reprodukálható módon mérhető paramétert kerestünk, melynek ismerete és esetleges befolyásolása kedvező hatással lehet a beültetett vese és/vagy a transzplantált beteg hosszútávú túlélésére, életminőségére.

Módszerek

Intézetünkben 1991 júniusában indult a cadaver veseátültetési program. A biztonság érdekében mind a donorműtét, mind a beültetés során azonos elveket, standardizált technikát alkalmaztak a műtétet végző sebészek. A betegek a műtétet követően pár napot intenzív osztályon töltenek, majd a posztoperatív első hónapot a különleges kialakítású Transzplantációs Osztályon. Ezt követően minden beteg előre meghatározott, szigorú protokollnak megfelelően vesz részt a posztoperatív gondozásban, melyet saját szakrendelőnk végez.

A jelen tudományos munka elvégzéséhez szükséges adatokat és vérmintákat a szakrendelőben, utógondozáson megjelent betegektől nyertük. A részletes tájékoztatást és a beleegyező nyilatkozat aláírását követően 72 beteget vontunk be a vizsgálatba 2009. január és 2011 áprilisa között. A vérvétel idejében minden páciens betöltötte a 18. életévét és beleegyezett adatai tudományos célú feldolgozásába.

Már a vizsgálat elején két jól elkülönített betegcsoportot alkottunk. Az egyik csoportban a résztvevő betegek vesefunkciója normális volt és fontos kikötés volt, hogy náluk az átültetés óta legalább 7 évnek kellett eltelnie (NRF). A másik betegcsoportban alapvető követelmény volt, hogy biopsiával igazolt krónikus allograft nephropathiajuk (CAN) legyen.

A veseműködés ellenőrzése érdekében laborvizsgálat során elemeztük a szérum kreatinin koncentrációját, a glomerulus filtrációs rátát (GFR), a vizelet fehérje koncentrációját és rögzítettük a vízajtó kezelés tényét is. Vizsgáltuk a betegek életkorát, nemét, testtömegét, testtömeg index értékét (BMI) és haskörfogatát is. A vérnyomás vizsgálatokor standardizált körülmények között mértük a systolés és diastolés értékeket, valamint a szívfrekvenciát is, és kiszámoltuk az arteriás középnyomást (MAP). A betegek dokumentációjából kiemeltük az alkalmazott antihipertenzív szerek számát, típusát és dózisát. A

kórtörténet felvételekor rákérdeztünk a dohányzási szokásokra, valamint a cukorbetegség meglétére. A laborvizsgálat során néztük az éhgyomri vércukorszintet, valamint elemeztük a lipidszinteket (total-cholesterin, LDL-cholesterin, HDL-cholesterin és triglycerid).

A CAN etiológiai faktorait retrospektív módon dokumentáltuk és elemeztük. Vizsgáltuk a HLA-egyezés mértékét, valamint a cytotoxicus antitest titert, az akut rejekciós epizódok számát, a donorok életkorát, a későn induló grafftunkció előfordulását (DGF), valamint a hideg ischaemias idő hosszát (CIT). Mint a graft hosszútávú túlélését befolyásoló tényezőt, vizsgáltuk a donor és a recipiens cytomegalovírus (CMV) antigén statusát, valamint a transzplantációt követően alkalmazott immunszuppresszív szerek típusát is.

ACE I/D polymorphismus meghatározása

A genomi DNS-t perifériás vér fehérvérsejtjeiből izoláltuk FlexiGene[®] DNA Kit segítségével. A polymorphismus meghatározást polymeráz láncreakcióval (PCR) végeztük a Rigat és munkatársai által leírt módszert követve. A genotipizáláshoz – a PCR amplifikációt követően – a termékeket 5%-os polyacrilamid gélen történt elektroforézissel elválasztottuk és ethidium-bromid festéssel azonosítottuk.

A serum ACE koncentrációja

A vérmintákat 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a serumot centrifugálással különítettük el (1 000 g, 15 perc) és a meghatározásig fagyasztoóban (-20°C) tároltuk. Az ACE koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg (Human ACE ELISA development system), a gyártói utasításoknak megfelelően. Az ACE-koncentráció meghatározásához rekombináns ACE-standard sort használtunk. Minden adat legalább három mérés átlaga, de a kísérletet néha a 15% alatti szórás érdekében többször ismételtük.

A serumban mért ACE-aktivitás

A szérumminták ACE-aktivitását Beneteau és munkatársai módszere alapján határoztuk meg.

A minták ACE-aktivitását az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\text{Aktivitás} = (S / k) * D,$$

ahol S az illesztés meredeksége (1/min), k az 1 μmol FAPGG hasítását követő optikai-denzitáscsökkenés, D a szérum hígításának mértéke. Az ACE-aktivitás értékét unitban (U) adtuk meg, úgy hogy 1 U annak az enzimaktivitásnak a mértéke, ami 1 perc alatt 1 μmol FAPGG-t hasít.

Szív ultrahang

A szív ultrahang (UH) vizsgálatot a betegek követése során végeztük, amely az általános gyakorlat része. A korábban említett 72 beteg közül azokat választottuk ki, akiknél az átültetést követően 4 hónapon belül, valamint egy évvel később és az utánkövetés során még legalább egy alkalommal készült részletesen leletezett és jól dokumentált echocardiographias vizsgálat.

Mindannyiuknál kétdimenziós és M-mód, valamint Doppler-felvételek készültek, standard metszeti síkokban, a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének echocardiographiás laboratóriumában. Az első echo átlagosan négy hónappal a vesebeültetést követően ($0,29 \pm 0,08$ év), a második csaknem egy évvel később ($1,20 \pm 0,24$ év) készült. A harmadik vizsgálatnak az utánkövetés során fellelhető legutolsó szív UH vizsgálatát tekintettük minden betegnek. Ez átlagosan hét évvel a transzplantációt követően készült ($7,17 \pm 2,53$ év).

A bal kamrai izomtömeg indexet (LVMI) használtuk a bal kamrai hypertrophia (LVH) mértékének meghatározására. A számításokhoz az alábbi UH-os úton mért paramétereket használtuk: bal kamrai diastolés átmérő (LVIDD), a szív hátsó falának diastolés vastagsága (PWTd), valamint a szeptum diastolés vastagsága (SWTd).

Ezen adatok felhasználásával az alábbi formula segítségével számoltuk ki a bal kamrai izomtömeget (LVM):

$$\mathbf{LVM} = 0,8 \times \{1,04 [(LVIDd+PWTd+SWTd)^3-(LVIDd)^3]\} + 0,6 \text{ (g)}.$$

A betegek testfelszínét (BSA) a DuBois és DuBois formula segítségével számítottunk ki:

$$\mathbf{BSA} = (W^{0,425} \times H^{0,725}) \times 0,007184 \text{ (m}^2\text{)},$$

ahol a W a testsúlyt, a H a testmagasságot jelöli.

Ezt követően a bal kamrai tömegindexet (LVMI) a bal kamrai izomtömeg és a testfelszín hányadosaként kaptuk meg:

$$\mathbf{LVMI} = \text{LVM} / \text{BSA} \text{ (g/m}^2\text{)}$$

Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatokat a folyamatos változók esetében t-próbával, míg a kategorikus változók esetében khi-négyzet (χ^2) teszttel végeztük.

A vesefunkció és az LVMI közötti összefüggést lineáris regresszió analízis segítségével vizsgáltuk.

Minden analízist a GraphPad Prism[®] 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) szoftver segítségével végeztünk. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a *p*-érték kisebb volt, mint 0,05.

Eredmények

Chronicus allograft nephropathia (CAN)

Szövettani vizsgálat során 38 beteg esetében igazolták a CAN diagnózisát (CAN csoport). A normális vesefunkciójú csoportba 34 olyan veseátültetésen átesett beteget választottunk, akik több mint 7 éve estek át a műtéten és a graft működése normál salakanyagszintet biztosított nekik (NRF csoport). Ebben a csoportban a kreatininszint átlagosan $95,68 \pm 17,17 \mu\text{mol/l}$ volt.

A férfi:nő arány a CAN csoportban 24:14 volt, míg az NRF csoportban 23:11. A betegek átlagéletkora a transzplantációkor a CAN csoportban 37 év volt, míg az NRF csoportban 42 év. Az átültetés és a biopsia között a CAN csoportban átlagosan 5,2 év telt el. A veseátültetés és a vizsgálatba történő bevonás között a kontroll csoportban (NRF) hosszabb idő telt el – átlag 11,2 év – mint a CAN csoportban, ahol 8,3 év.

A kontroll csoportban (NRF) a szérum kreatinin és a vizelet fehérjekoncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a GFR értéke magasabb. A CAN csoportban csaknem minden beteg (37 a 38-ból) diureticus kezelésben részesült. A kontroll csoportban lévő betegek testtömeg indexe (BMI) magasabb volt, csakúgy, mint a haskörfogatuk és a HDL-cholesterin koncentrációjuk. A CAN csoportban több beteg dohányzott.

Nem volt különbség a két csoport között a HLA egyezés, a cytotoxicus antitest titer mértékében, a későn induló graftfunkció (DGF) gyakoriságában, a hideg ischaemias idő átlagos hosszában, valamint a cytomegalovirus statusokat illetően sem.

A CAN csoportban gyakrabban fordult elő heveny kilökődéses epizód (AR) és a donorok átlagéletkora is szignifikánsan magasabb volt. Minden vizsgálatba bevont beteg calcineurin inhibitor (CNI) alapú immunszuppresszív kezelésben részesült.

Az ACE II genotípus előfordulási aránya nem különbözött a két vizsgált betegcsoportban. A CAN csoportban 13%, míg az NRF csoportban 12% volt az előfordulás gyakorisága ($p=0,83$). Ezzel szemben a CAN csoportban az ID előfordulása csak 55% volt, míg az NRF csoportban 71% ($p=0,02$). A DD genotípus lényegesen gyakrabban fordult elő a CAN csoportban (32%), mint azoknál a betegnél, akik vesefunkciója normális volt (NRF, 18%, $p=0,02$).

Az ACE koncentrációja az II homozigóták esetében volt a legalacsonyabb, míg a DD genotípusú betegnél a legmagasabb ($p=0,02$). Az ID heterozigótáknál mért ACE koncentráció a két homozigóta érték közé esett.

Vizsgáltuk a szérumban az ACE aktivitását is. A kapott eredmények jó összefüggést mutattak az ACE expresszióval, azon betegeknél, akik nem részesültek ACE-gátló kezelésben ($n=38$). A gén aktivitása az II genotípusú betegcsoportban volt a legalacsonyabb, ennél magasabb az ID heterozigótáknál és a legmagasabb értéket a DD homozigóta csoportban mértük. Ez utóbbi csoportnál kapott érték szignifikánsan magasabb volt, mindkét másik csoport értékeinél (ID vs DD $p<0,01$, II vs DD $p=0,01$).

Vizsgáltuk az ACE-gátló kezelés hatásosságát is. Azon betegeknél, akik nem részesültek ACE-inhibitor kezelésben az átlagos enzimaktivitás 30 U/l volt, míg az ilyen kezelésben részesülő betegeknél szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk (11 U/l, $p<0,01$).

Bal kamrai hypertrophia

A betegek bal kamrai izomtömeg indexe (LVMI) szignifikáns összefüggést mutatott a szérumban kreatinin és az eGFR értékekkel.

Az ACE gén polymorphismusa és a bal kamrai hypertrophia közötti kapcsolat vizsgálata során az LVMI érték alapján súlyossági fokozatokba soroltuk a betegeket. Az LVH diagnózisának határértéke nőknél 95 g/m^2 , míg férfiaknál 115 g/m^2 volt.

Az első echocardiographias vizsgálat idejében az II genotípusú betegek 67%-nál, minden heterozigótánál (ID: 100%), míg a DD homozigóták 86%-nál volt megállapítható az LVH valamely súlyossági fokozata. A második vizsgálat idején az II homozigóták 67%-nál, az ID heterozigóták 82%-nál, míg a DD genotípusúak 86%-nál. A harmadik UH-os vizsgálat során az II genotípusú betegek 67%-nál, az ID genotípusúak 76%-nál, míg a DD homozigóták esetén 86%-ban állt fenn az LVH diagnózisa.

A bal kamrai hypertrophiát – az Amerikai Echocardiographias Társaság ajánlása szerint – abban az esetben minősítettük súlyos fokúnak, ha az nők esetében meghaladta a 122 g/m^2 -t, míg férfiak esetében a 149 g/m^2 -es értéket. Az első szívultrahangos vizsgálat idején az II homozigótáknál egy esetben sem találtak súlyos fokú LVH-t (II: 0%), míg az ID genotípusúaknál 82%-ban, a DD homozigótáknál pedig 57%-ban volt fellelhető. A második echocardiographia során súlyos fokú LVH-t az II genotípusú betegek egyharmadában (33%), az ID genotípusúak 59%-ban, míg a DD homozigótáknál 57%-ban írtak le. Az utánkövetés során legutoljára elvégzett UH-os vizsgálat alkalmával súlyos fokú LVH-t az II homozigóták 33%-nál, az ID heterozigóták 53%-nál, míg a DD genotípusú betegek 71%-nál találtak.

Megbeszélés

Chronicus allograft nephropathia

A veseátültetés a krónikus vesebetegségben szenvedők számára a legjobb therapiás alternatíva, összevetve a vesepótló kezelés különböző formáival. Az életkorban megfelelő egészséges populáció adataival összehasonlítva azonban a várható élettartam rövidebb. A transzplantált betegek túlélését elsősorban a kardiovaszkuláris betegségek korlátozzák, melynek hátterében a gyakran előforduló magas vérnyomás és a bal kamrai hypertrophia állhat. A graft elvesztésének leggyakoribb oka a krónikus allograft károsodás.

A magas vérnyomás és a célszervkárosodás etiológiájának tanulmányozásakor közös pontként azonosítható a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) nefropátiás betegekben is. Olyan biomarkerek azonosítását céloztuk meg, amely könnyen nyerhető és alkalmas lehet a betegek fenti betegségekre való hajlamának jóslására.

Az angiotenzin-konvertáló enzim I/D polymorphismusát Rigat és munkatársai írták le először és jellemezték hatását a szérumban keringő enzim koncentrációjára is. Ezt a közleményt az elmúlt évtizedekben számos további tanulmány követte. Miután az ACE-gátlókkal végzett kezelés lassítja a vesebetegség progresszióját, feltehető, hogy alacsonyabb ACE koncentrációval rendelkező egyének kevésbé hajlamosak vese- illetve kardiovaszkuláris betegségekre. Mindenesetre, ennek vizsgálata során változó eredményeket értek el, ami köszönhető a különböző vizsgálati protokolloknak, a megválasztott végpontoknak, a beteg kiválasztásnak, az alkalmazott statisztikai és interpretációs módszereknek is.

Ezt támasztja alá, hogy Broekroelofs és munkatársai az ACE I/D polymorphismusának vizsgálata során sem a donor, sem a recipiens I/D polymorphismusa és a grafttúlélés között nem találtak összefüggést. Ezzel

ellenkezőleg, Lovati és szerzőtársai arra a következtetésre jutottak, hogy a DD genotípusú betegeknel a betegség progressziója szignifikánsan gyorsabb, mint a heterozigótáknál, vagy az II homozigótáknál.

Akcaj és munkacsoportja az ACE gén DD homozigóta variánsa és a chronicus allograft dysfunctio (CAD) kialakulása között egyértelmű összefüggést mutatott ki. Rodríguez-Moreno és munkatársai szintén pozitív összefüggést találtak, viszont nem csak a DD homozigóta esetekben, hanem már a D-allél hordozásakor is. Ezt erősítették meg vizsgálatukban Azarpira és szerzőtársai is. Eredményeik között kiemelték, hogy uraemiás betegek esetén szignifikánsan magasabb volt a DD genotípus frekvenciája, mint a normál vesefunkciójú csoportban. Ezen eredményeket Slowinski és Ayed vizsgálatai nem erősítették meg.

Többek között ezen tanulmányok és közlemények tanulságainak elemzését követően állítottuk fel saját vizsgálatunk protokollját. Kiemelten fontosnak tartottuk, hogy a két vizsgálati csoport a vizsgálni kívánt tulajdonságban élesen elkülönülő legyen. A CAN diagnózisánál a klinikai és laboratóriumi paraméterek mellett mindenképpen egy objektív vizsgálatra, a graft biopsziájának szövettani eredményére kívántunk támaszkodni. Megbízható eredményekre csak úgy számíthatunk, ha megfelelően hosszú követési időszakot választunk, vagy – retrospektív vizsgálatnál – kellően hosszú idő telik el a beavatkozás (Tx) és a vizsgált esemény bekövetkezése (CAN diagnosisa), és így az adatok elemzése között. Annak érdekében, hogy a multifaktoriális etiológájú betegség vizsgálatánál minden kórok és az ezek közötti esetleges additív összefüggés is feltáráshoz kerüljön, megbízható dokumentációra és precíz elemzésre volt szükség. Ezzel nem mellékesen a korábbi vizsgálatok eredményeit is tesztelhetjük és a saját betegcsoportjaink megfelelő elkülönülését is igazolhattuk.

Esetünkben a CAN diagnosist minden betegnél szövettani vizsgálat eredményére alapoztuk. A normál vesefunkciójú csoportban minimum 7 év telt el a

Tx-t követően. Vizsgáltuk a CAN minden ismert immunológiai és non-immunológiai etiológiai faktorát.

Eredményeink azt mutatták, hogy a korábban igazolt rizikótényezők közül a mi esetünkben is pozitív összefüggés volt kimutatható a donor életkora, valamint az akut kilökődés gyakorisága és a CAN kialakulása között. Az ACE I/D polymorphismusa és a veseátültetést követően kialakuló CAN között egyértelmű, statisztikailag igazolt összefüggés mutatható ki. A CAN csoportban szignifikánsan nagyobb a DD genotípus előfordulási gyakorisága. A vizsgálatok során a genotípus és az enzim koncentrációja, valamint aktivitása között is összefüggést tudunk kimutatni.

Bal kamrai hypertrophia

1990-ben publikálták a Framingham Heart Study eredményeit, melyben külön kitérnek a bal kamrai izomtömeg prognosztikai jelentőségére. A vizsgálat egyértelműen kimutatta, hogy a bal kamrai izomtömeg növekedésével nő a kardiovaszkuláris betegségek incidenciája, a szív-érrendszeri eredetű mortalitás és csökken a túlélés.

A bal kamrai hypertrophia kezelésének sarkalatos pontja a RAS gátlók alkalmazása. Morath és szerzőtársai megvizsgálták a RAS gátlás jelentőségét és alkalmazhatóságát veseátültetést követően. Fontosnak tartják, hogy vesetranszplantált betegeknél RAS-blokád hatására csökkent a szív bal kamrai izomtömege és a bal kamrai hypertrophia mértéke.

Önmagában a sikeres veseátültetés is csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót és jótékony hatása van a túlélésre. Iqbal és munkatársai azt találták, hogy már három hónappal a transzplantációt követően szignifikánsan csökkent az LVMI. Eredményeiket a bal kamrai átmérő csökkenésével magyarázzák, aminek hátterében a volumenterhelés csökkenése állhat, de kiemelik az anaemia és a vérnyomás megfelelő kontrolljának szerepét is.

A közlemények többsége egyetért abban, hogy a szív morfológiai és funkcionális eltérései szignifikánsan gyakoribbak a veseátültetett betegeken, mint az átlagpopulációban. Abban is széles körű a megegyezés, hogy a multifaktoriális etiológiájú LVH önálló rizikófaktor és a rendkívül gyakori CV szövődmények nagy részéért felelőssé tehető. Abban azonban nem volt teljes a megegyezés, hogy a LVH kialakulásában van-e szerepe a genetikai tényezőknek.

Munkánk során a betegek szív ultrahangos vizsgálatai között hosszabb idő telt el, így kiegyenlítődtek az egyéb etiológiai faktorok hatásai és nem befolyásolta eredményeinket a korai morfológiai javulás, melyet az átültetést követő első 1-2 évben írunk le. Eredményeink alapján egyértelmű összefüggés volt kimutatható a vesefunkció és az LVMI között. A szív ultrahangos vizsgálatok eredményei pedig azt igazolták, hogy a DD genotípusú betegek esetén gyakoribb és a követési idő során növekvő tendenciát mutat a súlyos fokú LVH előfordulása.

Összefoglalás

Eredményeink alapján elmondható, hogy az ACE gén I/D polymorphismusa nagy jelentőséggel bír mind az átültetett vese, mind a recipiens hosszú távú túlélésében.

A DD genotípus fokozott rizikót jelent mind a krónikus allograft károsodás kialakulásában, mind a súlyos fokú bal kamrai hypertrophia előfordulásának tekintetében.

Az ACE gén I/D polymorphismusának ismerete nem csak arra ad lehetőséget, hogy a beteg és a graft túlélését megbecsüljük, hanem a speciálisan ható szerek alkalmazásával célzott therapiás beavatkozásra is lehetőségünk adódik. A korábban megkezdett és személyre szabottan alkalmazott RAS-gátló kezelés lehetőséget teremthet a vese krónikus károsodásának megelőzésére, a folyamat progressziójának lassítására és a kardiovaszkularis rizikó csökkentésével a beteg életminőségének javítására és túlélésének növelésére is.



Iktatószám: DEENKÉTK/98/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Fedor Roland
Neptun kód: IMTGVZ
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
Mtm azonosító: 10038841

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fedor, R.**, Asztalos, L., Lócsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., Fagyas, M., Lizanecz, E., Tóth, A.:
Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme predicts left ventricular hypertrophy after renal transplantation.
Transplant. Proc. 43 (4), 1259-1260, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.064>
IF:1.005
2. **Fedor, R.**, Asztalos, L., Lócsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., Fagyas, M., Lizanecz, E., Tóth, A.:
Insertion/Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme as a risk factor for chronic allograft nephropathy.
Transplant. Proc. 42 (6), 2304-2308, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.020>
IF:0.993





További Közlemények

3. Uri, K., Fagyas, M., Mátyiné Siket, I., Kertész, A., Csanádi, Z., Sándorfi, G., Clemens, M., **Fedor, R.**, Papp, Z., Édes, I., Tóth, A., Lizanecz, E.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: Circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure.
PLoS One. 9 (4), 32 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087845>
IF:3.73 (2012)
4. Bene, L., Ungvári, T., **Fedor, R.**, Sasi Szabó, L., Damjanovich, L.: Intensity correlation-based calibration of FRET.
Biophys. J. 105 (9), 2024-2035, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.041>
IF:3.668 (2012)
5. Lőcsey L., Seres I., Sztanek F., Harangi M., Padra J., Kovács D., **Fedor R.**, Asztalos L., Paragh G.: Relationship Between Serum Paraoxonase and Homocysteine Thiolactonase Activity, Adipokines, and Asymmetric Dimethyl Arginine Concentrations in Renal Transplant Patients.
Transplant. Proc. 45 (45), 3685-3687, 2013.
IF:0.952 (2012)
6. Kovács, D., Szabó, L., **Fedor, R.**, Laczik, R., Soltész, P., Lőcsey, L., Asztalos, L.: Prospective Study of Changes in Arterial Stiffness among Kidney-Transplanted Patients.
Transplant. Proc. 43 (4), 1252-1253, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.074>
IF:1.005
7. Lőcsey L., Szlanka B., Borbás B., Ménés I., Asztalos L., Szabó L., **Fedor R.**, Kovács D., Lőrincz I.: Összefüggések az augmentációs index, a pulzus hullám terjedési sebesség valamint a metabolikus eltérések között vesetranszplantált betegekben.
É- K-mo. Orv. Szle. 11, 5-15, 2010.
8. Lőcsey L., Szlanka, B., Borbás, B., Szabó, L., Dán, A., Asztalos, L., **Fedor, R.**, Ménés, I., Lőrincz, I.: Arterial stiffness in chronic renal failure and after renal transplantation.
Transplant. Proc. 42 (6), 2299-2303, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.017>
IF:0.993



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



9. Asztalos, L., Olvasztó, S., **Fedor, R.**, Szabó, L., Balázs, G., Lukács, G.: Renal Artery Aneurysm at the Anastomosis After Kidney Transplantation.
Transplant. Proc. 38 (9), 2915-2918, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.08.115>
IF:0.962

10. Asztalos L., Kincses Z., Berczi C., Szabó L., **Fedor R.**, Lőcsey L., Balázs G.: Vesetranszplantált betegek akut hasnyálmirigy-gyulladásá =Acute pancreatitis after kidney transplantation.
Magyar Seb. 54 (12), 91-94, 2001.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13.308

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 1.998

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.06



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tóth Attilának, aki mindig nyugalommal és segítőkészen állt hozzám. Tudta mikor kell munkára sarkallni és mikor kell hagyni szunnyadni bennem az alkotó „erőt”. Stílusa és szakértelme a mindennapokban is példaként szolgált számomra.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Édes István és Prof. Dr. Damjanovich László intézetvezetőknek, akik lehetővé tették, hogy munkámat a Kardiológiai és a Sebészeti Intézetben is végezhessem.

Nagyrabecsülésemet és hálámat kell kifejeznem Dr. Asztalos László főorvosnak és Prof. Dr. Papp Zoltánnak, akik pártolták és segítettek munkámat a Transzplantációs Centrumban és a Klinikai Fiziológiai Tanszéken.

A minták és az adatok gyűjtésében óriási segítséget nyújtott Miskuly Mária és Zabolai Csabáné.

Szavakkal nem kifejezhető az a segítőkészség és szeretet, amit a Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársaitól kaptam. Soha nem fogom tudni meghálálni Dr. Fagyas Miklós, Mányiné Siket Ivetta és Pásztorné Tóth Enikő türelmét, segítségét és azt a jó hangulatot, ami egyszerre inspirált és szórakoztatott.

Köszönetet érdemel a Vesetranszplantációs Osztály (Tanszék) új vezetője, Dr. Nemes Balázs, és minden dolgozója, aki hozzájárult ezen munka elkészültéhez.

Az elmúlt évek minden napján, a munka minden fázisában bátran támaszkodhattam feleségem és szerető családom támogatására. Ők biztosították a nyugodt hátteret és sokszor az erőt, kitartást is a munkához, amit nem lehet elégszer megköszönni.

Ez a munka a Magyar Kormány és az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045).