

A DOHÁNYZÁS SZEREPE A KRÓNIKUS VESEBETEGSÉGEKBEN

Doktori (PhD) értekezés tézisei

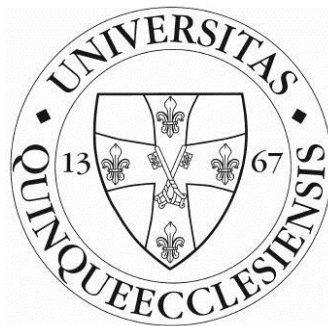
Dr. Halmai Richárd

A Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Komoly Sámuel

Program és Témavezető:

Prof. Dr. Wittmann István



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum

2013

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ach	acetilkolin
ATP	adenozin trifoszfát
BaCl ₂	bárium klorid
BMI	testtömegindex
CaCl ₂ ·2H ₂ O	kalcium klorid
Ca _v 1.2	L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatorna
CKD	krónikus vesebetegség
CO	szénmonoxid
CO ₂	széndioxid
CS	cigarettaázás
CSB	cigarettafüst puffer
DM	diabétes mellitusz
DNP	diabéteszes nefropátia
bGFR	becsült glomeruláris filtrációs ráta
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
GSH	glutation, redukált forma
HbA _{1c}	hemoglobin A _{1c}
HR	szívfrekvencia
ING	idiopátiás noduláris glomeruloszklerózis
K _{ATP}	ATP-szenzitív kálium csatorna
KCl	kálium klorid
KH ₂ PO ₄	kálium dihidrogén foszfát
KW	Kimmelstiel-Wilson
LiCl	lítium klorid
MAP	artériás középnyomás
mg/c	miligramm cigarettaánsként
Mg ₂ SO ₄	magnézium szulfát
NaCl	nátrium klorid
NaHCO ₃	nátrium bikarbonát
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ cseretranszporter
NGS	noduláris glomeruloszklerózis
NO	nitrogén monoxid
non-diab NGS	nem diabéteszes noduláris glomeruloszklerózis
non-KW	a diabéteszes nefropátia Kimmelstiel-Wilson lézió kívüli típusai
ODQ	oxadiazolo-quinoxalin-1
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
RI	rezisztencia index
SD	standard deviáció
SH group	szulfhidril csoport
SOD	szuperoxid diszmutáz
TEA	tetraetil ammónium
wCS	a cigarettafüst vízdékony komponensei

BEVEZETÉS

A dohányzás általános szerepe a krónikus vesebetegségekben és a diabéteszes nefropátiában

A dohányzás elleni küzdelem egy világméretű probléma. A 2000-es évek elején világszerte 1,2 milliárd ember dohányzott, 2030-ra pedig 1,6 milliárd dohányost prognosztizálnak. A dohányzás káros hatásai folytán jelenleg évente 5 millió ember hal meg, és amennyiben a jelenlegi trend folytatódik, 2030-ra az áldozatok száma megduplázódik. A krónikus cigarettázásnak mind az aktív mind a passzív formája káros, a krónikus vesebetegség (CKD) kialakulásában és progressziójának felgyorsításában is szerepet játszik, ill. a 2-es típusú diabétesz mellitusz (DM) és a diabéteszes nefropátia (DNP) kialakulásában és lezajlásában valamint a cukorbetegség szív- és érrendszeri szövődményeiben is jelentős tényező.

Ismert, hogy a krónikus veseelégtelenség a szív- és érrendszeri megbetegedés és halálozás esélyét növeli, így a dohányzás olyan káros szenvedély, ami mind az életminőséget, mind pedig a várható élettartamot csökkenti. A szervezetben létezik egy ún. "dohányzási memória", a káros következmények és az emelkedett betegség kockázat ugyanis a leszokást követően még évekig jelen van.

A dohányzás a leggyakoribb krónikus vesebetegségek megjelenésében és kedvezőtlen lefolyásában is szerepet játszik. Ezek a diabéteszes nefropátia, iszkémiás nefropátia, nefroszklerózis, a leggyakoribb primer glomerulonefritisz (IgA nefropátia), a leggyakoribb cisztás vesebetegség (autoszomális domináns policisztás vesebetegség), ill. néhány ritkább betegség is, amilyen például a lupusz nefritisz. A dohányzás inzulinrezisztenciát okoz, így fokozza a 2-es típusú diabétesz és a metabolikus szindróma kialakulásának az esélyét. Mind 1-es mind 2-es típusú diabéteszben a cigarettázás növeli a vesebetegség kialakulásának és progressziójának a kockázatát. Ezen betegségek patomechanizmusa összetett és még nem teljesen feltérképezett, így minden egyes beteg számára fontos volna ha vesebetegsége kialakulásának lépéseit megismernénk. Azokra a tényekre és feltevésekre szeretnénk rávilágítani, amelyek egy olyan káros szenvedély elleni küzdelemben segíthetnek, ami nem csak az érintett személy, hanem a közvetlen környezete, családtagjai, barátai és más ártatlanok életét is tönkretelheti.

Nagy esteszámú keresztmetszeti epidemiológiai vizsgálatok (IRISA, PREVENT) alapján nem válogatott populációban azt találták, hogy a nemdohányosokhoz képest a dohányosok glomeruláris filtrációs rátája (GFR) magasabb és a microalbuminuria ill. a proteinuria esélye is nagyobb ebben a csoportban. Egészséges egyéneknél egy szál cigaretta elszívása átmeneti vérnyomásemelkedéshez és GFR-csökkenéshez vezet, ugyanakkor az albuminuria változása a normál tartományon belül nem tisztázott. Egyes feltételezések alapján dohányzás közben az akut szisztémás vérnyomásemelkedés és a vese autoregulációjának változása emelkedett intraglomeruláris nyomáshoz vezethet.

A diabétesz mellitusz, ezen belül is elsősorban a 2-es típus előfordulása világszerte rohamosan növekvő tendenciát mutat, a diabéteszes nefropátia pedig a végstádiumú veseelégtelenség leggyakoribb oka. A DNP kórlefolyása és a szövettani elváltozások ismertek, azonban a pontos patomechanizmus máig bizonytalan. Diabéteszes nefropátiában ritkán kerül sor a vesebiopszia elvégzésére, holott más gyakori vesebetegségekhez képest ritkábban fordul elő vérzéses szövődmény. A mindennapi gyakorlatban csak akkor végzünk vesebiopsziát, ha a diabéteszes nefropátián kívül más eredetű vesebetegséget is feltételezünk, a nem-diabéteszes vesebetegség pedig a 2-es típusú diabéteszben gyakoribb, mint az 1-es típusban. A DNP nemrég elfogadott, konszenzuson alapuló szövettani klasszifikációja a Kimmelstiel-Wilson (KW) léziót külön osztályba sorolja (III-as osztály). A KW lézióval egyező szövettani elváltozást nem diabéteszes vesebetegekben is leírták és "idiopátiás noduláris glomeruloszklerózisnak" (ING) nevezték el. Az ING egy extrém ritka entitás, melynek hátterében oki tényezőként elsősorban a krónikus dohányzást ill. a hipertóniát feltételezik. A betegségre a "dohányzáshoz kapcsolódó noduláris glomeruloszklerózis" elnevezés is napvilágot látott, valamint sokkal gyakoribb férfiakban mint nőkben. Számos tényező ismert (dohányzás, hipertónia, obesitas, hiperlipidémia, veseelégtelenség), amely mind a DNP progressziójához mind pedig az ING kialakulásához hozzájárulhat. A KW léziós betegeknel a fenti rizikótényezők pontos aránya ill. előfordulása még nem ismert.

CÉLKITŰZÉSEK

- 1) Első, *humán* vizsgálatunk célja az volt, hogy nyomon kövessük a cigarettázás hemodinamikai paramétereire és a veseerek tónusára kifejtett akut hatását.

Ennek megfelelően nikotin tartalmú vagy nikotinmentes cigarettafüst, ill. áldohányzás szegmentális veseerek rezisztencia indexére (RI), az artériás középnyomásra és a szívfrekvenciára kifejtett akut hatását vizsgáltuk.

- 2) Második, *ex vivo* kísérletsorozatunk során a cigarettafüst vízdékony komponenseinek patkány veseerekre kifejtett akut hatását elemeztük a lehetséges patomechanizmus feltárása céljából.

- a. Patkány izolált veseereken különböző töménységű nikotin tartalmú és nikotinmentes cigarettafüst hatásait elemeztük.
- b. A dohányfüst-okozta veseér relaxációban vizsgáltuk az endotélium, a szénmonoxid (CO) és a nitrogén monoxid (NO) jelentőségét.
- c. Az erek tónusát befolyásoló szabadgyökök szerepét tanulmányoztuk a cigarettafüst hatására kialakuló veseér-relaxációban.
- d. Górcső alá vettük az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatorna ($Ca_v1.2$) és a Na^+-Ca^{2+} cseretranszporter (NCX) szerepét a dohányfüst kiváltotta veseartéria reakcióban.

- 3) Harmadik, *retrospektív, klinikai tanulmányunkban* célunk a krónikus dohányzás Kimmelstiel-Wilson lézióban betöltött szerepének vizsgálata volt.

Adatbázisunkból natív vesebiopszián átesett férfibetegeket válogattuk ki, majd három csoportba soroltuk őket: diabéteszes nefropátiás betegek Kimmelstiel-Wilson lézióval; diabéteszes nefropátiás betegek Kimmelstiel-Wilson lézió nélkül (negatív kontroll); nem diabéteszes betegek noduláris glomeruloszklerózissal (pozitív kontroll). A három csoportban számos klinikai paramétert és a betegek dohányzási szokásait hasonlítottuk össze.

MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK

1. A cigarettafüst humán veseartériákra kifejtett akut hatásainak *in vivo* vizsgálata.

1.1. Felhasznált anyagok és módszerek

A vizsgálatba 21 és 41 éves kor közötti egyébként egészséges dohányos férfiakat (n=8) vontunk be. A vizsgált személyek átlagosan napi 17,7±6,9 cigarettát szívtak el, a dohányzás időtartama 13,3±5,0 évnek bizonyult. A vesebetegség lehetőségét kizártuk, a tanulmány résztvevői 8 órával a vizsgálat előtt abbahagyták a dohányzást, majd 5 perc alatt elszívtak egy cigarettát (kátrány: 10 mg/c, CO: 10 mg/c, nikotin: 0.8 mg/c). Egy radiológus kolléga kiválasztott egy szegmentális veseartériát majd ennek Doppler spektrumának változását követte nyomon. A rezisztencia indexet [RI= (szisztolés csúcsebesség – végdiasztolés sebesség)/szisztolés csúcsebesség] a kiválasztott érben 3 perccel a rágyújtás előtt, a cigaretta elszívása közben percenként, majd a cigaretta elszívását követő 3. percben detektáltuk, az elszívás alatti legalacsonyabb értéket rögzítettük. A szisztémás vérnyomást és a szívfrekvenciát ugyanezen időszak alatt hasonlóképpen nyomon követtük. Egy következő tanulmányban másik napokon ugyanezt a protokollt ugyanezen személyekkel megismételtük, azonban a nikotin tartalmú cigaretta helyett először áldohányzást (a cigaretta rágyújtás nélküli szívása), majd nikotinmentes cigarettát alkalmaztunk. Az RI-ben, artériás középnyomásban (MAP) és a szívfrekvenciában (HR) bekövetkezett változásokat a cigaretta meggyújtása előtt kapott érték százalékos arányában fejeztük ki. A tanulmányt a helyi Etikai Bizottság jóváhagyta (N°: 3344), minden résztvevő írásos beleegyezését adta.

A statisztikai szignifikancia megállapításához a humán vizsgálatokhoz, majd a későbbi állatkísérletekhez t-próbát alkalmaztunk. Minden vizsgált paraméter normál eloszlást mutatott, az adatokat átlag ± szórásban (SD) adtuk meg. A tesztek az SPSS program 15.0-ás verziójával végeztük (SPSS, Chicago, IL, USA), a 0,05-tel egyenlő, ill. ez alatti értékeket tartottuk szignifikánsnak.

1.2. A humán tanulmány eredményei

A fiatal egészséges férfiakban a nikotin tartalmú cigaretta elszívása a szegmentális veseartériák rezisztencia indexében átmeneti és szignifikáns (P<0,05) csökkenést okozott.

A nikotinmentes cigaretta elszívása az RI-ben, a nikotin tartalmú cigarettához hasonlóan, szignifikáns ($P < 0,05$) csökkenést okozott.

Az áldohányzás nem idézett elő szignifikáns változást a rezisztencia index-értékekben.

A nikotin tartalmú cigaretta mind az artériás középnyomás, mind a szívfrekvencia átmeneti emelkedéséhez ($P < 0,05$) vezetett, ugyanakkor sem a nikotinmentes cigaretta sem az áldohányzás nem befolyásolta ezeket a paramétereket szignifikáns mértékben.

2. A cigarettafüst patkányvese-artériákra kifejtett akut hatásainak *ex vivo* vizsgálata.

Az előző tanulmányban bemutattuk, hogy a cigarettázás a humán veseartériák rezisztencia indexének átmeneti csökkenését idézi elő, ami ezen erek dilatációjára utal. Ebben az *ex vivo* kísérletsorozatban a cigarettafüst vízdékony komponenseinek (wCS) izolált szegmentális patkányvese-artériákra kifejtett hatásait vizsgáltuk a jelenség mechanizmusainak a feltárása céljából.

2.1. Anyagok és módszerek

Fésűs és munkatársai módosított módszerét alkalmaztuk. A cigarettafüst puffert úgy készítettük, hogy egy szál cigaretta füstjét 5ml Krebs pufferen keresztül (összetevők: 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 1.2 mM Mg_2SO_4 , 11.1 mM glükóz, 1.6 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH:7.4) áramoltattuk át, hogy ezáltal a füst vízdékony komponensei a pufferbe kerüljenek.

A kísérletekhez 10-12 hetes, 300-350 g súlyú felnőtt hím CFY fajtájú patkányokat használtunk fel. A veseartériák elsődleges oszlása utáni 150-200 μm átmérőjű erekből 2 mm hosszú szakaszokat preparáltunk ki, majd az érgyűrűbe két 40 μm átmérőjű rozsdamentes acél drótot fűztünk bele. Ezt követően az ereket 4 kamrás multimyographba (610M típus) helyeztük, majd itt standard körülmények között, Krebs pufferben, folyamatosan 95% O_2 és 5% CO_2 összetételű gázzal áramoltattuk át és 37°C-on "fürdettük". A nyugalmi feszülés/belső átmérő arányt minden egyes érnél külön-külön meghatároztuk, majd egy normalizációs lépést követően 30 perces stabilizációs periódus következett, ezután az izometriás feszülést folyamatosan rögzítettük. Az erek kontrakciós képességét 60mM-os KCl oldattal teszteltük. Az endotél működését a 60mM-os KCl-lel előfeszített ereknek acetilkolin ($\text{ACh } 3 \times 10^{-6} \text{ M}$) hatására bekövetkezett elernyedésével

vizsgáltuk, a több mint 50%-os relaxációt tekintettük megfelelőnek. Bizonyos esetekben az endotél eltávolítását egy, az érlumenbe helyezett hajszál finom körkörös mozgásával értük el, majd a beavatkozás sikerét az acetilkolinra adott válasz megszűnésével ellenőriztünk. Az első kísérletsorozatban az érgyűrűket a 60mM-os KCl okozta kontrakció 60%-át eredményező 100nM-os epinefrinnel feszítettük elő annak érdekében, hogy a későbbiekben a körülmények változásakor mind relaxációs mind kontrakciós válaszra képesek legyenek. Egy stabil kontrakciós plató elérését követően az ereket tartalmazó kamrákba cigarettafüst puffert kevertünk úgy, hogy ezzel 1- 5- ill. 10%-os emelkedő füstkoncentrációt értünk el. A cigarettafüst vízzeloldékony komponensei (wCS) által okozott relaxáció mértékét egy párhuzamosan vizsgált kezeletlen kontroll érhez képest százalékos arányban adtuk meg. A szolubilis guanilat cikláz gátló 5 μ M-os oxadiazolo-quinoxalin-1-et (ODQ), az ATP-érzékeny kálium csatornát (K_{ATP}) gátló 10 μ M-os glibenklamidot, vagy a nagy konduktanciájú kalcium-aktiválta kálium csatornát blokkoló 2 mM-os tetraetilammóniumot (TEA) az epinefrin hatására bekövetkező kontrakciós plató kialakulása előtt 30 perccel adtuk az érkamrákba. A szabadgyökfogókat (4mM-os glutation; 1000 U/ml-es kataláz; 200U/ml-es szuperoxid diszmutáz=SOD) egyrészt hozzáadtuk a wCS oldatokhoz másrészt a korábbihoz hasonlóan 30 perccel az epinefrin kiváltotta kontrakciós plató kialakulása előtt az érkamrákba helyeztük.

Egy második kísérletsorozatban módosított depolarizáló Krebs puffer által előidézett kontrakciókat vizsgáltunk. Az erek Krebs pufferrel történt háromszori átmosását majd 20 perces várakozást követően az oldat $CaCl_2$ komponensét 3,2mM-os $BaCl_2$ -dal helyettesítettük, ami kontrakciót idézett elő. Ez az összehúzódás képezte a kontrollt. Ezután az érszakaszokat három alkalommal Krebs pufferrel mostuk át, majd 20 perc várakozást követően $BaCl_2$ -dal újabb összehúzódást idéztünk elő. A kísérletet 5%-os cigarettafüst puffer vagy az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornát blokkoló 10nM-os nifedipin jelenlétében is megismételtük. A $BaCl_2$ hatására bekövetkező válaszokat önmagában, ill. a cigarettafüst vagy nifedipin jelenlétében regisztráltuk, majd a CSB/kontroll és a nifedipin/kontroll kontrakciók arányait kiszámoltuk. Az eredményeket kezeletlen ereken észlelt két egymást követő, $BaCl_2$ -okozta kontrakcióra normalizáltuk.

Egy harmadik kísérletsorozatban a Krebs puffer NaCl tartalmát ekvimoláris arányban LiCl-lel helyettesítettük, mely a Na^+ - Ca^{2+} cseereceptorer aktiválását idézte elő. A kísérleti protokoll ezt követően a második kísérletsorozathoz hasonlóan zajlott. A kiváltott

kontrakciókat 1%-os cigarettafüst puffer jelenlétében vagy a Na^+ - Ca^{2+} cseretranszportert specifikusan gátló 2 μM -os SEA400 jelenlétében regisztráltuk.

A reagenseket - a SEA0400 kivételével - a Sigma Chemicals cégtől vásároltuk, a SEA0400-at Prof. Dr. Fülöp Ferenc, a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetének tanszékvezetője biztosította számunkra.

A kísérletek a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottságának hivatalos engedélyezésével zajlottak (N°: BA02/2000-1/2008).

2.2. Az állatkísérletek eredményei

Mind a nikotin tartalmú-, mind a nikotinmentes cigarettafüst vízdoldékony komponensei a patkányvese-artériákon dózisfüggő relaxációt okoztak (1%-os nikotin tartalmú dohányfüstpuffer: $41,18 \pm 14,86\%$ -os relaxáció; 5%-os puffer: $79,28 \pm 8,91\%$ -os relaxáció; 10%-os puffer: $90,3 \pm 6,1\%$ -os relaxáció, $P < 0,05$), melyet sem az endotél eltávolítása, sem a szolubilis guanilát cikláz inhibitor oxadiazolo-quinoxalin-1, sem a nem specifikus kálium csatorna blokkoló tetraetilammónium, sem a kálium dependens ATP csatornát blokkoló glibenklamid nem befolyásolt szignifikánsan. Ugyanakkor a relaxációt a hidrogén-peroxidot elbontó kataláz csökkentette (1000 U/mL kataláz + 5% nikotin tartalmú dohányfüstpuffer: $49,71 \pm 18,4\%$, $P < 0,05$), a hidrogén-peroxid képződéséhez vezető szuperoxid diszmutáz pedig növelte (200 U/mL SOD + 5% nikotinos dohányfüstpuffer: $95,7 \pm 2,3\%$, $P < 0,05$). A redukált glutation (a tiol oxidáció egyik gátlója) a wCS-okozta érrelaxációt szintén szignifikánsan csökkentette. A nikotin tartalmú cigarettafüst az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornát blokkoló nifedipinhez és a Na^+ - Ca^{2+} cseretranszportert gátló SEA400-hoz hasonló módon csökkentette a veseartériákon előidézett specifikus kontrakciót.

3. A krónikus dohányzás szerepének retrospektív vizsgálata a diabéteszes noduláris glomeruloszklerózis (Kimmelstiel-Wilson lézió) kialakulásában.

3.1. Betegek és módszerek

A Pécsi Tudományegyetem 2-es sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum adatbázisából a 2001 és 2011 között natív vesebiopszián átesett férfibetegeket ($n=644$)

válogattuk ki, majd három csoportba soroltuk őket: diabéteszes nefropátiás betegek Kimmelstiel-Wilson lézióval (n=15), diabéteszes nefropátiás betegek Kimmelstiel-Wilson lézió nélkül (n=46), nem diabéteszes betegek noduláris glomeruloszklerózissal (n=7). A vesebiopsziákat immunfluoreszcens, fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálattal elemeztük. Retrospektív elemzésünk során a három csoportban számos, a diabéteszes nefropátia vagy a noduláris glomeruloszklerózis progressziójában, ill. kiváltásában szerepet játszó klinikai paramétert és a betegek dohányzási szokásait hasonlítottuk össze. A 2-es típusú cukorbetegséget az ajánlásoknak megfelelően definiáltuk. A KW lézió megállapításának a diabétesz mellitusz kórismézésén kívül a szövettani vizsgálat során legalább egy glomerulusban észlelt noduláris mezangiális szklerózis (egyszersmind az összes glomerulus kevesebb mint 50%-ában látott globális szklerózis mellett) valamint számos betegség egyidejű fennállásának kizárása (krónikus membranoproliferatív glomerulonefritisz, krónikus trombotikus mikroangiopátia, amiloidózis, monoklonális immunglobulin depozíciós betegség, fibrilláris glomerulonefritisz, ill. immunotaktoid glomerulopátia) volt a feltétele. A szövettani leírások áttekintésén túl a DNP progresszióját fokozó ill. az NGS kialakulását előidéző alábbi faktorokat is vizsgáltuk mindhárom csoportban: a vesebiopszia idején észlelt kor, testtömegindex (BMI), diabétesz tartam, hipertónia megléte (RR>140/90Hgmm) ill. fennállásának ideje, a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAAS) antagonistá kezelés, szérum összkoleszterin- és triglicerid szint, glikémiás kontroll (HbA_{1c}), valamint a becsült glomeruláris filtrációs ráta (bGFR). A különböző csoportok alanyainak dohányzási szokásait az orvosi dokumentáció elemzésén kívül standardizált telefonos kérdőív segítségével pontosítottuk. Mind a diabéteszes mind a nem diabéteszes betegcsoportokat dohányzó- és nem dohányzó kategóriákba soroltuk. A dohányzás mértékét csomagévekben fejeztük ki (1 csomagév egy éven keresztül napi 1 doboz cigaretta elszívásának felelt meg).

A statisztikai vizsgálatokhoz mindig a megfelelő (ANOVA, kí-négyzet és Kruskal-Wallis, ill. Bonferroni) tesztekkel alkalmaztuk. A szérum összkoleszterin, triglicerid, bGFR és a csomagéven kívül minden paraméter normál eloszlást mutatott. Az adatokat átlag ± szórás értékekben adtuk meg. A tesztekkel az SPSS program 17-es verziójával végeztük, a 0,05-tel egyenlő ill. ennél kisebb értékeket értékeltük szignifikánsnak.

3.2. A retrospektív klinikai tanulmány eredményei

Nefrológiai Centrumunkban a 2001 és 2011 közötti időszakban férfibetegektől nyert natív vesebiopsziás anyagunkban (n=644) a 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő DNP-s páciensek aránya 9,5%-nak (n=61) bizonyult, 15 fő (2,3%) KW lézióval, míg 46 fő (7,2%) a DNP más szövettani típusával rendelkezett. A nem diabéteszes noduláris glomeruloszklerózis aránya 1.1% (n=7) volt, ebből két betegnél idiopátiás noduláris glomeruloszklerózis (0.3%) öt betegnél (0.8%) ismert betegséghez kapcsolódó nem diabéteszes NGS mutatkozott.

Mind a KW mind a non-diab NGS csoport többsége krónikus dohányosnak bizonyult (KW: 13/15= 87%, non-diab NGS: 7/7=100%, P=1,0) a non-KW csoporttal ellentétben (16/46= 35%; p=0,001 vs. KW). A cigaretta csomagévek száma a három csoportban a dohányzási szokásokhoz hasonló arányokat mutatott (KW: 15 {6-30}, non-KW: 0 {0-21}, non-diab NGS: 30 {16-33}; P=0,010 non-KW vs. KW, P=0,008 non-KW vs. non-diab NGS). A diabéteszes nefropátia progresszióját, ill. a nem diabéteszes noduláris glomeruloszklerózis kialakulását befolyásoló egyéb tényezőkben nem találtunk szignifikáns különbséget a három csoport között (KW, non-KW, non-diab NGS): kor: 56±1, 56±9, 55±1, p=0,935; testtömeg index: 30±5, 31±5, 28±6 kg/m², p=0,538; diabétesz tartam: KW: 11±6, non-KW: 10±7 years; p=0,617; HbA_{1c}: 6,5±1, 6,0 ±1%; p=0,88; hipertónia előfordulása: 93, 87, 86%; p=0,782; hipertónia időtartama: 11±8, 13±10, 11±6 years; p=0,948; szérum összkoleszterin: 5,2 {4,0-6,3}, 5,5 {4,3-7,2}, 5,7 {4,7-9,9} mmol/l; p=0,500; szérum triglicerid: 2,0 {1,4-2,7}, 2,4 {1,6-3,1}, 3,4 {1,1-3,6} mmol/l; p=0,784; becsült glomeruláris filtrációs ráta: 25 {13-48}, 42 {20-70}, 42 {23-77} ml/min; p=0,483; renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert gátló gyógyszeres kezelés aránya: 100%, 87%, 100%, p=0,222). A kezdeti proteinuria mindhárom csoportban jelentősnek bizonyult. Míg a KW és a non-diab NGS betegcsoport egymástól nem különbözött (KW: 3,7±1,7 g/nap; non-diab NGS: 5,8±4,2g/nap; p=1,0 {a logaritmusos értékekre vonatkoztatva}), addig a non-KW csoportban a fehérjeürítés kisebb volt (non-KW: 2,3±1,6g/nap). A KW és a non-KW csoport között a különbség nem volt szignifikáns (p=0,153 {a logaritmusos értékekre vonatkoztatva}), a non-KW és a non-diab NGS csoport között pedig éppen elérte a szignifikancia határát (p=0,042 {logaritmusos értékekre vonatkoztatva}).

MEGBESZÉLÉS

A cigarettafüst humán veseartériákra kifejtett akut hatásának *in vivo* vizsgálata, valamint a cigarettafüst patkányvese-artériákra kifejtett hatásának *ex vivo* elemzése alapján az alábbi két megállapításra jutottunk: 1) Egészséges egyéneknél mind a nikotin tartalmú mind a nikotinmentes cigaretta elszívása a szegmentális veseartériák rezisztencia indexének átmeneti csökkenését eredményezi. 2) A nikotin tartalmú és a nikotinmentes cigarettafüst vízdoldékony komponensei a patkányveseartériákon dóziszfüggő relaxációhoz vezetnek. Utóbbi hatást sem az endotél eltávolítása, sem a szolubilis guanilát cikláz gátlása, sem a nagy-konduktanciájú kalcium-aktiválta kálium csatornák blokkolása, sem az ATP-függő kálium csatornák gátlása nem befolyásolta. A relaxáció mértékét a kataláz csökkentette a szuperoxid diszmutáz pedig növelte.

Korábbi humán tanulmányok azt mutatták, hogy egy cigaretta elszívására a légutak vérátáramlása átmenetileg fokozódik. Ehhez hasonlóan dohányzás alatt Doppler vizsgálattal igazolták a portális véna átmérőjének megnövekedését. E két eredményből kiindulva azt feltételeztük, hogy a dohányosoknál a wCS a veseerek relaxációjához vezethet, ami az egyidejű szisztémás artériás középnyomás emelkedéssel és az endotél sérüléssel valamint endotél diszfunkcióval a vesékben hiperfiltrációt és albuminuriát eredményezhet. Humán vizsgálatunkban szegmentális veseartériákban az érátmérő változásainak közvetett nyomon követésére alkalmas rezisztencia indexet (RI) tanulmányoztuk. A mély belégzés során kialakuló paraszimpatikus aktivációval járó hatás szerepét ún. áldohányzással mértük fel. Az RI-t a szívfrekvencia is befolyásolhatja, azonban vizsgálatunkban a nikotinmentes cigaretta úgy eredményezett a nikotin tartalmú cigarettához hasonló csökkenést az RI értékekben, hogy a szívfrekvenciát a nikotinos cigarettával ellentétben szignifikánsan nem befolyásolta. A jelen tanulmányban egyértelműen bizonyítottuk, hogy egy cigaretta elszívása az RI átmeneti csökkenését eredményezi, ami a vizsgált szegmentális veseartériák és/vagy a disztálisabb rezisztenciaerek tágulására utal.

A dohányfüst vízdoldékony komponenseinek hatására az izolált patkányveseartériákban dóziszfüggő relaxációt észleltünk. A nikotinnak, mint a cigarettafüst legtöbbet vizsgált alkotóelemének oki szerepe a vizsgált folyamatban elvethető, mivel a nikotinmentes cigaretta a nikotin tartalmúhoz hasonló relaxációt okozott. A nikotinmentes cigaretta sem a

szisztémás vérnyomásban sem a szívfrekvenciában nem okozott érdemi változást, mely eredmény az irodalmi adatokkal egyezik. A szénmonoxid oki szerepét valószínűtlenné teszi, hogy az érhatását közvetítő szolubilis guanilát cikláz ill. a nagy konduktanciájú kalcium-aktiválta kálium csatornák blokkolása nem befolyásolta a füst- okozta relaxációt, továbbá irodalmi adatok alapján a CO vérszintje egy cigaretta elszívása után még 30 perc múlva is magas, ugyanakkor a veseerek dilatációja rövidebb ideig - átlagosan öt percig - tartott. A folyamatban sem az endoteliális nitrogén monoxid szintáz sem a nitrogén monoxid nem lehet meghatározó, mivel sem az endotél eltávolítása sem a szolubilis guanilát cikláz gátlása nem befolyásolta szignifikánsan a relaxációt.

Ismert, hogy mind a cigarettafüstben található, mind az érszövetben képződő szabadgyökök befolyásolhatják az erek tónusát. A hidrogénperoxid endotél- és simaizomfüggő mechanizmusokon keresztül is vazodilatációt eredményezhet. Jelen tanulmányunkban a veseartériákat az irodalmi adatokhoz hasonló 1-10%-os wCS-sel inkubáltuk. Eredményeink alapján a hidrogénperoxidot elbontó kataláz szignifikánsan csökkentette a dohányfüst- okozta veseartéria relaxációt, míg a SOD - ami a szuperoxidot hidrogénperoxiddá alakítja – a relaxációt növelte. Ezek alapján a wCS eredményezte relaxációért részben a dohányfüstpufferben jelen levő és/vagy az érfalban SOD hatására képződő hidrogénperoxid tehető felelőssé. A mechanizmus elsősorban simaizom-függő, mivel az endothelium eltávolítása nem idézett elő érdemi változást a relaxációban. A reaktív oxigén gyökök különböző ioncsatornákat és transzportereket szabályozhatnak. Korábbi közlések alapján koronáriákban a tiol-oxidáció egy redox típusú vazodilatációs mechanizmust aktiválhat, melyben az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornák keresztül kalcium beáramlás gátlásának van szerepe. Vizsgálatunkban a GSH - mely a tiol oxidáció egyik gátlója – csökkentette a wCS- okozta relaxációt.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a bárium ion kálium csatornák gátlásán keresztül simaizom depolarizációhoz, majd az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornák keresztül kation beáramláshoz vezet. Kísérletünkben a BaCl₂- okozta veseartéria kontrakciót az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornát gátló nifedipin csökkentette. Az 5%-os wCS ugyanolyan kísérleti körülmények között hasonló kontrakciócsökkentő hatással bírt. A nifedipin és a wCS barium-indukálta kontrakciót gyengítő szembeszökően hasonló hatása alapján feltételezhető, hogy a wCS relaxáló efektusában az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornának is van jelentősége. Ezen adatok támogatják azt az

elképzelést, hogy az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlása redox folyamatokon keresztüli szabályozás útján valósulhat meg.

Amennyiben a Krebs pufferban a NaCl-t ekvimoláris LiCl-re cseréljük, úgy a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporteren keresztüli Ca²⁺ beáramlás a simaizom átmeneti kontrakcióját eredményezi. Vizsgálatunkban a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszportert specifikusan gátló SEA0400 alkalmazásával a litium indukálta kontrakció csökkenését tapasztaltuk. Az 1%-os töménységű wCS a SEA0400-hoz hasonló mértékben redukálta a litiumos kontrakciót, ami a cigarettafüst vazomotor tónusra kifejtett hatásában a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporter szerepét felveti. Figyelemre méltó az a nemrég megfigyelés, hogy a H₂O₂ kardiomiocitákban a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporteren található tiolok oxidatív módosítását eredményezte.

Az eddigieket összegezve feltételezzük, hogy egyrészt a dohányfüst vízdékony komponensei között megtalálható és/vagy a szuperoxid anionból helyileg az érfalban képződő hidrogénperoxid részben felelős lehet a cigarettafüst által előidézett patkányvese-artéria relaxációért, valamint ez a mechanizmus emberben is elképzelhető. Mind az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornának mind pedig a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporternek valószínűleg szerepe van a fenti folyamatban, ennek alátámasztására azonban további kísérletek szükségesek.

A cigarettafüst vesehemodinamikára kifejtett kedvezőtlen akut hatása azt jelenti, hogy ha valaki 5/10/20 szál cigarettát szív el naponta, akkor naponta ennyiszor károsítja a veséit. Epidemiológiai vizsgálatok alapján a krónikus dohányzás a krónikus vesebetegségek kialakulásában és progressziójában egyaránt szerepet játszik. A CKD leggyakoribb oka a diabéteszes nefropátia, az azonban még nem tisztázott, hogy a DNP progressziójában a dohányzás csak egy rizikófaktor a sok közül, vagy a a betegség bizonyos formáiban esetleg kiemelkedő szerepet játszik.

Retrospektív tanulmányunkban az irodalomban először közöltük, hogy a KW lézióval rendelkező 2-es típusú cukorbeteg férfiak között a dohányosok aránya kiemelkedően magas. Ez az arány 87%-nak bizonyult, szemben a nem Kimmelstiel Wilson lézióval rendelkező 2-es típusú diabéteszes férfiaknál észlelt 35%-os aránnyal, ami az átlagpopulációtól érdemben nem különbözik. A DNP progressziójához hozzájáruló egyéb rizikófaktorok – a dohányzáson kívül – nem mutattak különbséget a KW ill. a non-KW csoportok között. A dohányzás kumulatív hatását jelző cigaretta csomagévek száma a két

noduláris glomeruloszklerózis csoportban (KW és non-diab NGS) a non-KW csoporthoz képest szignifikánsan nagyobb volt, így a non-KW betegcsoport negatív kontrollként szolgált. Érdekes módon nemcsak az ING csoportban találtuk 100%-osnak a krónikus dohányzás előfordulását, hanem az ismert betegségekhez (monoklonális immunglobulin depozíciós betegség, amiloidózis, immunotaktoid glomerulopátia, membranoproliferatív glomerulonefritisz) kapcsolódó NGS-ben is. A dohányzás-okozta vesekárosodás hátterében számos potenciális mechanizmust feltételeznek, munkacsoportunk a hiperfiltrációs elméletet támasztotta alá. A dohányzás akután szisztémás vérnyomásemelkedést okoz, valamint a veseartériák átmeneti relaxációjához is vezet. A vesében a dohányfüst okozta endotélsejt- és podocitakárosodás, valamint az endotél diszfunkció következtében a filtrációs rendszer krónikus károsodása, továbbá az intraglomeruláris nyomás napi számos alkalommal bekövetkező emelkedése egyaránt fontos szerepet játszhat az NGS patomechanizmusában. Ezek a folyamatok a diabéteszes és nem diabéteszes populációban is megfigyelt hiperfiltrációhoz és emelkedett albuminuriához vezethetnek. Tanulmányunkban a nemzetközi irodalomhoz hasonlóan összefüggést találtunk a krónikus dohányzás mértéke és a proteinuria súlyossági foka között, ami alátámasztja a dohányzásnak a jelentőségét a proteinuria kialakulásában. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a diabéteszes nefropátia progressziójához vezető számos tényező közül a krónikus dohányzás kiemelkedő szerepet játszhat a Kimmelstiel-Wilson-féle noduláris glomeruloszklerózis kialakulásában.

TÉZISEK

- 1) "Egészséges" krónikus dohányosokban egy cigaretta elszívása a szegmentális veseartériák rezisztencia indexének (RI) akut csökkenését eredményezi.
- 2) A humán szegmentális veseartériákban cigarettázás során bekövetkező RI csökkenés átmeneti, a folyamat nem nikotin-függő.
- 3) Mind a nikotin tartalmú mind a nikotinmentes cigarettafüst vízdoldékony komponensei izolált patkányvese artériákban dózis-függő relaxációt okoznak.
- 4) A patkányvese-artériákban a nikotin tartalmú cigarettafüst indukálta relaxáció hátterében elsődlegesen simaizom-függő mechanizmus áll, a folyamatban sem a nitrogénmonoxid sem a szénmonoxid szerepe nem meghatározó.
- 5) A cigarettafüst-okozta patkányvese-artéria relaxációt a kataláz csökkenti, a szuperoxid diszmutáz pedig növeli, ami arra utal, hogy a veseartériák vazomotor tónusának a csökkentésében részben a hidrogénperoxidnak lehet szerepe. A hidrogénperoxid közvetlenül a cigarettafüst vízdoldékony részéből is származhat és/vagy szuperoxid anionból helyben az érfalban is termelődhet.
- 6) A patkányvese-artériákban a dohányfüst hatására kialakuló vazomotor válaszban valószínűleg mind az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatorna mind a Na^+ - Ca^{2+} cseretranszporter szerepet játszik.
- 7) 2-es típusú diabéteszes férfiakban a krónikus dohányzás kiemelkedő szerepet játszhat a Kimmelstiel Wilson-féle noduláris glomeruloszklerózis kialakulásában.

A Doktori tézisekhez kapcsolódó publikációk jegyzéke

Közlemények:

Halmi R, Szijártó IA, Fehér E, Fésüs G, Molnár GA, Brasnyó P, Fülöp F, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. Cigarette smoke elicits relaxation of renal arteries. *European Journal of Clinical Investigation*. 2011;41 (2):195-202. (impact factor (IF): 3.018)

Halmi R, Wittmann I. Potential role of cigarette smoking in two emerging endemic diseases: chronic kidney disease and diabetes mellitus. Chapter 9. In: Chen GG: *Cigarette Consumption and Health Effects*. USA, NY; Nova Publishers. 2013. P: 123-154.

Halmi R, Degrell P, Szijártó IA, Mátyás V, Molnár GA, Kovács T, Wittmann I. Smoking as the potential link between Kimmelstiel-Wilson lesion and non-diabetic nodular glomerulosclerosis in male patients – a single center retrospective study. *Clinical Nephrology*. 2013. Epub ahead of print: DOI 10.5414/CN107812. (IF in 2011: 1.171)

Dr. Halmi Richárd, Dr. Fehér Eszter, Dr. Németh Kinga és mtsai. Veseelégtelenség, hipertenzív és diabéteszes nefropátia. *Granum*. 2012 XV(4): 7-10.

Válogatott kongresszusi kivonatok:

Halmi R, Fésüs G, Tóth P, Koller A, Wittmann I. Water-soluble components of cigarette smoke elicit endothelium independent relaxation of rat renal arteries. *Abstract: Journal of Vascular Research*. 45 (Suppl. 2) 2008; 118. (IF: 2.792)

Halmi R, Szijártó IA, Brasnyó P, Fésüs G, Tóth P, Pusch G, Koller A, Wittmann I. Water extracts of cigarette smoke elicit smooth muscle dependent relaxation of rat renal arteries. *Abstract: The FASEB Journal*. 2009; 23: 804.23 (IF: 6.401)

Halmi R, Fehér E, Mérei A, Szijártó IA, Brasnyó P, Fésüs G, Tóth P, Pusch G, Koller A, Wittmann I. Water soluble substances of cigarette smoke elicit relaxation of renal arteries of rats and humans. *Abstract: NDT Plus*. 2009; 2(suppl 2): ii219 doi:10.1093/ndtplus/2.s2.43 (IF: 3.306)

Halmi R, Szijártó IA, Mérei Á, Degrell P, Wittmann I. Chronic cigarette smoking could contribute to diabetic nodular glomerulosclerosis. *Abstract: Diabetologia*. 2010; 53:(Suppl1) S475. (IF: 6.973)

Halmi R, Degrell P, Szijártó IA, Molnár GA, Wittmann I. Smoking as the potential link between Kimmelstiel-Wilson lesion and idiopathic nodular glomerulosclerosis. *Abstract: Diabetologia*. 2012; 55:(Suppl1) (IF in 2011: 6.814)

Halmi Richárd, Fésüs Gábor, Tóth Péter, Koller Ákos, Wittmann István. A dohányfüst vízdékony komponensei izolált renális artériákban endotheliumtól független vazorelaxációt okoznak. *Magyar Hypertonia Társaság XVI. Kongresszusa. Hypertonia és Nephrologia*. 2008; Program és Előadáskivonatok gyűjteménye. „A legjobb elméleti előadás díj”

Halmi Richárd, Szijártó István András, Mérei Ákos, Degrell Péter, Brasnyó Pál, Wittmann István. A dohányzás a diabéteszes nodularis glomerulosclerosis egyik lehetséges oki tényezője. *Abstract: Diabetologia Hungarica*. 2010; XVIII. évf. 1. Suppl. 109.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyon hálás vagyok az alábbi Embertársaimnak:

- Prof. Dr. Wittmann István témavezetőmnek, amiért elindított a tudományos pályán és azóta is folyamatos biztatását és támogatását köszönhetem;
- Prof. Dr. Nagy Juditnak, amiért a máig is működő beteg-központú klinikánk megteremtésével a belgyógyászat felé fordította figyelmemet;
- Dr. Degrell Péternek az alapos együttműködésért és hogy megismertette velem a vesepatológia számos rejtelmét;
- Dr. Szijártó István Andrásnak a kitartó és fáradhatatlan munkáért amit az állatkísérletek folytatásánál tanúsított;
- Dr. Molnár Gergő Attilának a sok segítségért a hosszú statisztikai számolások során;
- Dr. Fehér Eszternek a nagyszerű közreműködésért amit sokszor "füstös" környezetben vitt véghez;
- Mátyás Viktóriának a nagyon precíz és gyors klinikai adatgyűjtéséért;
- Prof. Dr. Koller Ákosnak a nagyszerű és sokszor hosszú időt igénylő tudományos támogatásért és biztatásáért;
- Prof. Dr. Maik Gollaschnak és Prof. Dr. Friedrich C. Luftnak az altruista technikai támogatásért és a kiváló tudományos együttműködésért;
- Prof. Dr. Fülöp Ferencnek a szakmai kooperációért;
- Dusikné Dalma, Sámikné Varga Ica, Alina Bolboaca, Heitmanné Anikó, és Grozdicsné Visnyei Tünde asszisztensnőknek a kiemelkedő munkájukért;
- Dr. Fésüs Gábornak a sztereomikroszkópia és a mikrosebészeti ismeretek, valamint a miográf rejtelmeinek közvetítéséért;
- Dr. Szelestei Tamásnak a készséges és igen pontos kooperációért;
- Dr. Brasnyó Pálnak, Dr. Mazák Istvánnak, Dr. Wagner Zoltánnak és az összes név szerint nem említett klinikai Kollégának és PhD hallgatónak akik támogattak a tudományos munkámban;
- Bognár Péternek, Kovács Leventének, Bodor Enikőnek és az egész adminisztrátori csapatnak az informatika és a menedzsment néhol ingoványos területein nyújtott önzetlen segítségükért;
- az Egész Családomnak, hogy biztosították munkámhoz a békés hátteret, és ezáltal a tudományos és a klinikai munkámra jobban fókuszálhattam.