

Kardiovaszkuláris markerek a diabéteszes nefropátia különböző stádiumaiban

Doktori értekezés

Dr. Mácsai Emília

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Vásárhelyi Barna egyetemi tanár, MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Hamar Péter egyetemi docens, MTA doktora

Dr. Szelestei Tamás osztályvezető főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Somogyi Anikó egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Deák György osztályvezető főorvos, C.Sc.

Dr. Wágner László egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2013

|

Bevezetés

Az elmúlt néhány évben körvonalazódott a kardiometabólikus szindróma és a kardiorenális tünetegyüttes fogalma, a 2-es típusú diabétesz és a kardiovaszkuláris betegségek, ezen belül a szívbetegségek, valamint a krónikus veseelégtelenség összetartozásának gondolata. Napjainkban hangsúlyozott a betegek ún. multidiszciplináris szemléletű gondozása.

A diabéteszben kialakuló nefropátia és a kardiovaszkuláris betegségek alapját jelentő érfalkárosodás kialakulásában számos közös elem van: ilyen az oxidatív stressz, az endotél sérülés, és a gyulladás. Az említett folyamatokat előre jelző, a keringésben vagy a szövetekben detektálható biomarkerek vizsgálata a mielőbbi diagnózis és kezelés lehetőségét jelentheti. PhD munkám során ezeket a biomarkereket vizsgáltam.

A nátriuretikus peptideket nyomás- vagy volumen-túlterhelés esetén a szívizomsejtek termelik, progredáló krónikus veseelégtelenségben elsősorban az NT-proBNP használható kardiális biomarkerként. A troponinok miokardiális sérülés esetén kerülnek a keringésbe. Tünetmentes veseelégtelen betegekben a cTnT gyakrabban emelkedett, melyet szubklinikus sejtszétérés, urémiás toxinok direkt károsító hatása idéz elő. Mindkét kardiális biomarker összefügg dializált betegekben a kardiovaszkuláris mortalitással.

A gyulladós folyamatok az ateroszklerotikus plakkok kialakulásában játszanak szerepet, ezek markere a

hsCRP. Emellett gyulladáshoz markerként használják az IL-6 proinflammatorikus citokinszint emelkedését, illetve a döntően anti-inflammatorikus hatású IL-10 citokinszint csökkenését. A monocita/makrofág sejtek az ateroszklerózis valamennyi fázisában jelen vannak, a korai aterosclerosis léziók komplex léziókká alakulásában kulcsfontosságúak. A monociták szubendoteliális akkumulációjában az MCP-1 kemokin szerepe meghatározó.

A végstádiumú krónikus veseelégtelenségben szenvedő diabéteszes betegek szénhidrát-anyagcsere státuszának felmérésére a konvencionális glikémiás markerek (hemoglobin A1C szint) kevésbé alkalmasak. Az elmúlt néhány évben elérhetővé vált non-invazív, gyors és megbízható mérés, a bőr autofluoreszcencia (SAF) a dializált betegpopulációban ma már elfogadott, de széles körben egyelőre nem alkalmazott prediktív mortalitási marker, a kumulatív fluoreszcens szöveti AGE-depozíciót jelzi. Az viszont nem ismert, hogy a SAF-val kimutatott AGE-szint eltérésért milyen molekulák a felelősek.

A klinikai gyakorlatban a diabéteszes nefropátiás betegeknek rutinszerűen alkalmazott szerek fő hatása mellett egyéb szervrendszerekre, kardialis biomarkerekre kifejtett hatása csak részben karakterizált. PhD munkám során erre vonatkozóan is gyűjtöttünk adatokat.

Ennek kapcsán értékeltém a sztatinkezelés kardialis biomarkerekre gyakorolt hatását; a vérnyomáscsökkentő hatású doxazozin immunmoduláns tulajdonságait; illetve a húgysavszint csökkentésére adott allopurinol anyagcsereére gyakorolt hatásait.

Célkitűzés

Célkitűzésünk az volt, hogy a hazai diabéteszes és/vagy vesebetegek körében adatokat gyűjtsünk a kardiovaszkuláris betegségek biomarkereinek klinikai állapottal való összefüggéséről, valamint arról, hogy ezt a kapcsolatot egyes gyógyszerek hogyan befolyásolják.

Kardiális és gyulladásozó biomarkerek szintjét befolyásoló tényezők Hemodializált diabéteszes és nem diabéteszes betegcsoportokban vizsgáltuk a szérumban az NT-proBNP, a cTnT, a hsCRP, az IL-6, az IL-10 és az MCP-1 szintjét befolyásoló faktorokat, ezen analitok összefüggését a klinikai állapottal, két hemodialízis közötti időszakban mért ABPM-paraméterekkel, a bioimpedancia vizsgálat során megfigyelt folyadékterek nagyságával, az ismert diabéteszes szövődeményekkel.

Bőr autofluoreszcencia vizsgálat veseelégtelen, illetve diabéteszes betegekben Peritoneális dialízisben (PD) részesülő betegeknel értékeltük a bőr autofluoreszcencia (SAF) adatok és a klinikai paraméterek, valamint a terápia közötti kapcsolatot. Diabéteszes betegeknel azt vizsgáltuk, hogy a bőrben más módszerrel mérhető egyes glikációs végtermékek szintje és a SAF között van-e összefüggés.

Biomarkerek és rutinszerűen adott gyógyszerek Három, a diabéteszes populációban gyakran alkalmazott gyógyszer (doxazozin, a fluvasztatin és az allopurinol) esetében azt értékeltük, hogy ezek kifejtene-e a fő hatás mellett kedvező hatást a betegek kardiális biomarkereire, immun fenotípusára, illetve anyagcsere státuszára.

Betegek és módszerek

Betegek

Keresztmetszeti felmérést végeztünk 68, legalább 3 hónapja stabil állapotú hemodializált beteg bevonásával, akik közül 28 beteg volt diabéteszes. Kardiális biomarker vizsgálatok, a gyulladásos markerek közül a hsCRP, IL-6 és IL-10 mérések történtek körükben. A fluvasztatin hatását az NT-proBNP és cTnT szintek alakulására 65 diabéteszes hemodializált beteg esetében értékeltük.

Diabetológiai ambulancián gondozott 42 felnőtt páciens esetében elemeztük a szérum MCP-1 és a klinikai adatok kapcsolatát.

A T-sejt szubpopulációk változását (n=10) 2-es típusú diabéteszben (T2DM) szenvedő nefropátiás férfibetegben mértük fel.

A húgysav szintek alakulását 132 páciensből álló diabéteszes csoportban követtük.

A DESI-MS eredményeket 5 advanced glycation end product (AGE) molekula esetében 16 adolescens T1DM betegben hasonlítottuk össze az autofluoreszcencia eredményekkel.

A SAF mérés 198 krónikus peritoneális dialízis programban szereplő beteg esetében történt meg, körükben a DM előfordulása 47%-nak adódott.

Alkalmazott módszerek

Bioimpedancia vizsgálat

A testösszetételt bioimpedancia-vizsgálattal (BIA) mértük fel, InBody 3.0 Biospace multifrekvenciás

segmentális 8-elektrodás készüléket alkalmaztunk. A mérések álló helyzetben történtek, volumen-markerként az ecv/twv arány-értéket használtuk. A teljes test zsírtartalmat (fat mass %), és a testtömeg-indexet (BMI-t) egyidejűleg regisztráltuk.

Laboratóriumi vizsgálatok és klinikai adatok

A konvencionális laboratóriumi mérések a betegellátó egységekhez tartozó kórházi laboratóriumokban történtek, a klinikai adatokat a betegek dokumentációjának áttekintésével nyertük. A vizsgálatok során a kórházban a rutin diagnosztika céljára használt vegyszerekkel dolgoztunk.

Echokardiográfiás vizsgálat

Az echokardiográfiás mérések ALOKA 5505 szívultrahang - készülékkel, 2D metódussal, standard módon készültek. A bal kamrai tömegindex számításához a Devereux-Reichek, ill. a Gehan-George $\{BSA-m^2=0,0235x$ (testsúly-kg) $^{0,51456}x$ (testmagasság-cm) $^{0,42246}\}$ képletet alkalmaztuk.

Bőr autofluoreszcencia mérés

Az AGE Reader eszközzel (DiagnOptics, Groningen, The Netherlands) a szöveti autofluoreszcencia értéket 300-600 nm spektrumú tartományban mértük.

DESI-MS mérés

A páciensek ujjbegyét desztillált vízzel tisztítva a deszorpciós elektron-áram ionizációs tömegspektrometria (DESI-MS) meghatározást módosított OmniSpray ion-

forrással végeztük, melyet két spektrométerrel kapcsoltunk össze technikailag: TSQ Quantum triple quadrupole mass spectrometer és LTQ Orbitrap Discovery Fourier transform mass spectrometer.

Áramlási citometriás mérés

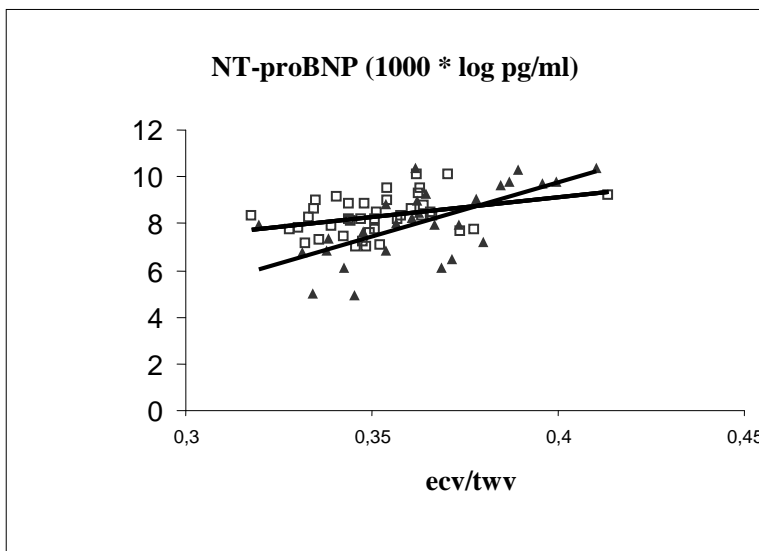
A perifériás vér mononukleáris sejtjeit a teljes vértől Ficoll-Paque Plus grádiens rendszer alkalmazásával szeparáltuk. Majd a minták további előkezelését követően BD FACS Aria rendszerrel vizsgáltuk. A két vizit időpontjában elemeztük az intracelluláris FoxP3 pozitivitást mutató sejtek (Treg sejtek), valamint a CD4, CD8, CD25 és CD69 expressziót mutató sejtek arányát.

Statisztikai módszerek

Az egyes biomarkereket befolyásoló tényezők független hatását multiregressziós ANOVA módszerrel elemeztük, a kapott szignifikáns összefüggéseket lineáris regresszióval értékeltük. A diabéteszes és nem diabéteszes csoportok összehasonlítását Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk. A korrelációt normál eloszlású változók esetében Pearson teszttel, a nem normál eloszlású csoportban Spearman rank teszttel analizáltuk.

Eredmények

Diabéteszes betegekben a hiperhidráció mértékének fokozódásával kifejezettebben emelkedik az NTpro-BNP (28 diabéteszes beteg: $r = 0,66$, $p = 0,001$; 40 nem diabéteszes beteg: $r = 0,35$, $p = 0,034$)



Az NTpro-BNP szintek összefüggése a volumen többletet jellemző ecv/twv diabéteszes (▲) és nem diabéteszes (□) betegpopulációkban; (ecv/twv: extracelluláris víztérfogat/teljes test víztérfogat BIA-módszerrel mérve)

Szignifikáns kapcsolatot nem találtunk a cTnT kardiális biomarker és az egyes extrakardiális diabéteszes szövődmények, gyógyszeresedés, nem, életkor, dialízisben eltöltött idő, tradicionális és non-tradicionális rizikófaktorok, HbA1C szint és a diabétesz időtartama között.

A diabéteszes hemodializált csoportban az átlagos erythropoietin dózis ($p = 0,03$), az összkoleszterin ($p=0,039$), és a BMI ($p=0,043$) mutatott szoros kapcsolatot a hsCRP-vel. A nem diabéteszes csoportban összefüggés ($p = 0,025$) volt a hsCRP és a szérumban a fibrinogén szintek között. A vizsgált diabéteszes betegcsoportban a testtömeg index ($p<0,00001$) és a testzsír % ($p=0,004$) nagyobb, mint a nem-diabéteszes hemodializált betegekben.

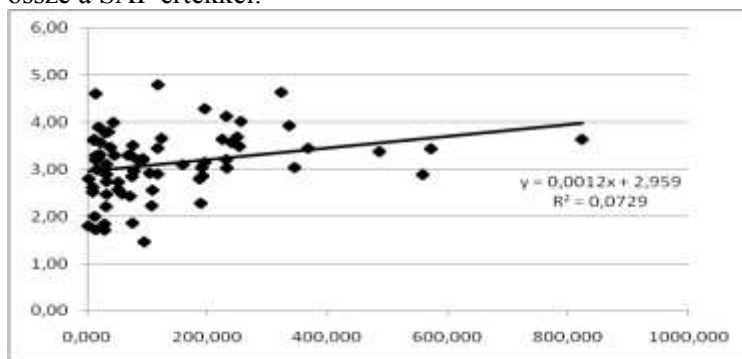
Az inflammációra utaló IL-6 szint ($p=0,02$) és IL-10 szint ($p=0,003$) a diabéteszes betegcsoportban a nem-diabéteszes hemodializált betegekkel összehasonlítva magasabb volt. A fibrinogén szintek szignifikánsan emelkedettebbnek mutatkoztak ($p=0,02$), a prealbumin szinteket pedig közel szignifikáns mértékben alacsonyabbnak találtuk ($p=0,054$).

A teljes ($n=42$) diabetológián gondozott betegcsoportban az albuminúria és a szérumban a MCP szint között egyenes arányt találtunk; ez a kapcsolat a CRP, HbA1C, BMI, LDL, szérumban a húgysav értékekre való korrekciót követően is fennmaradt ($p = 0,0231$). A CRP és a szérumban a MCP-1 szintek között nem volt összefüggés ($p=0,5042$). Az egyes diabéteszes szövődménnyel rendelkező és attól mentes betegcsoportok között egyetlen esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a szérumban a MCP-1-ben.

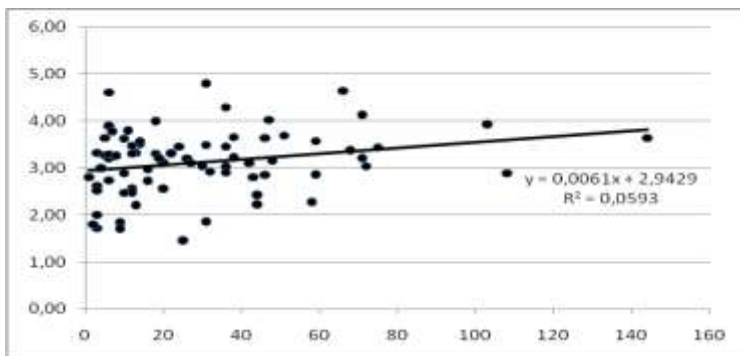
A peritoneális dialízisben részesülő betegcsoportban ($n=198$) a multivariációs analízis során a teljes betegpopulációban a SAF szignifikáns független prediktorának a beteg életkora ($p=0,15$), a diabétesz jelenléte ($p=0,012$), és az icodextrin kezelés ($p=0,005$)

mutatkozott. Az icodextrint kapó betegek nagyobb peritoneális ultrafiltrációval, kevesebb reziduális diurezissel és reziduális clearance-szel ($p < 0,001$) rendelkeztek. Gyakoribb volt a diabétesz mellitusz (60% vs 40%), és ez régebben állt fenn ($p = 0,01$). A betegek fiatalabbak voltak ($p = 0,02$), a PD-ben eltöltött idejük nem szignifikánsan ugyan, de hosszabb volt ($p = 0,07$). Nagyobb volt a kumulatív intraperitoneális glukóz expozíció ($p = 0,05$), magasabb volt a CRP ($p = 0,03$), és alacsonyabb a szérum albumin ($p = 0,09$), a szérum összkoleszterin és triglicerid ($p = 0,04$), és a szérum hűgysav szint ($p = 0,01$). A bőr autofluoreszcencia az icodextrinnel kezelt csoportban magasabbnak bizonyult ($p = 0,02$).

A nem-diabéteszes, és icodextrint sem használó alcsoportban ($n = 76$) a kumulatív glukóz-expozíció és a PD ideje függött össze a SAF értékkel.



X-tengely: glukóz-expozíció (kg) Y- tengely: SAF (elméleti egység)
Korreláció a SAF és az intraperitonális kumulatív glukóz expozíció között ($n = 76$) nonparametrikus Spearman r teszt eredményei alapján $r = 0,2941$; 95% CI $[0,06342-0,4949]$; $p = 0,011$.



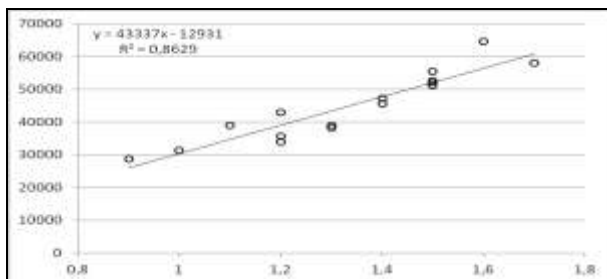
X-tengely : a PD-ben töltött idő (hónap) Y- tengely: SAF (elméleti egység) Korreláció a SAF és PD-ben eltöltött idő között (n=76) nonparametrikus Spearman r teszt eredményei alapján $r = 0,2478$; 95% CI [0,01678-0,4536]; $p = 0,0309$.

A bőr autofluoreszcencia és egyes AGE-molekulák (glukuronsav, 3-indoxil-szulfát, 3-hidroxi-butirát, fenol-szulfát, és pentozidin) bőrben mért szintjei között szignifikáns korrelációt ($p < 0,0001$) kaptunk .

A Pearson-korreláció eredményei a SAF és a DESI-MS között

	korr coeff(r)	95% CI	p érték	DESI-MS érték
glukuronsav	0,91	0,77 – 0,97	$p < 0,0001$	35789,3±8012,15
3-indoxil-szulfát	0,86	0,64 – 0,95	$p < 0,0001$	1054,5±247,41
3-hidroxi-butirát	0,91	0,76 – 0,97	$p < 0,0001$	6181,12±1666,57
fenol-szulfát	0,87	0,67 – 0,95	$p < 0,0001$	541,87±166
pentozidin	0,90	0,74 – 0,96	$p < 0,0001$	1191,5±394,78

Az 5 AGE-termék összegzett értéke korrelál a SAF-val (n=16)



A sztatin-származékot szedő betegek körében az NT-proBNP ($p=0,0089$) és a cTnT ($p=0,026$) szintjei alacsonyabbak voltak.

A 3 hónapos doxazosin szedés mellett a T2DM betegek reggeli hipertóniája, HbA1C értéke, teljes és LDL-koleszterin szintje, mikroalbuminúriája csökkent. Az egyes T-sejt alcsoportokban markáns eltérések mutatkoztak ezzel párhuzamosan, nőtt a CD4+FoxP3+/CD4+ ($p=0,009$) és CD4+CD25^{high}/CD4+ ($p=0,001$) sejtek, csökkent a CD4+CD69+/CD4+ ($p=0,003$) és CD8+CD69+/CD8+ ($p=0,022$) sejtek aránya.

A szérum húgysavszint a diabetológiai gondozottak között az újonnan allopurinolt kezdő betegek esetében csökkent. Az átlagos HbA1C szint szignifikánsan alacsonyabb volt a második vizit időpontjában az első vizithez képest. Az allopurinol kezelés minden időpontban kifejezett összefüggést mutatott az alacsonyabb HbA1C értékkel ($p<0,0001$).

Következtetések

Kardiális és gyulladásoz biomarkerek szintjét befolyásoló tényezők hemodializált és kezdeti stádiumú nefropátiás betegcsoportban

A kardiális biomarkerek közül az NT-proBNP szintje az általunk vizsgált hemodializált betegcsoportokban összefügg az extracelluláris/teljes testvíz arányával; a kapcsolat erősebb diabéteszben. Hemodializált betegekben a cTnT elsősorban a szívizomsejtek aktuális sérülésére utal. A gyulladásoz markerek közül ebben a betegcsoportban a hsCRP szintje diabétesz esetén összefügg az eritropoetin dózissal, az összkoleszterin szinttel és a BMI-vel, nem diabéteszes betegekben a szérúm fibrinogén szinttel. Hemodializált populációban az IL-6 és az IL-10 szintek magasabbak diabétesz esetén, az inflammatórikus folyamatokkal való összefüggésüket a szérúm fibrinogénnel és prealbuminnal való összefüggés megerősíti. A diabéteszes nefropátia kezdeti stádiumaiban a szérúm MCP-1 szint korrelál az albuminúria mértékével.

Bőr autofluoreszcencia vizsgálat veseelégtelen, illetve diabéteszes betegekben

A bőrben az AGE akkumulációt jelző SAF értéket peritoneálishan dializált betegcsoportban az életkor, a korábbi diabétesz, és az aktuálishan alkalmazott icodextrin kezelés befolyásolja szignifikánsan. Diabéteszes serdülőknél igazoltuk, hogy a SAF értékek több glikációs termék szintjével szoros kapcsolatban állnak.

Terápia hatása diabéteszes betegeknél a kardiális biomarkerekre, az immun fenotípusra, és az anyagcsere-státuszra

A kardiovaszkuláris markerek közül diabéteszes betegeknél az NT-proBNP és cTnT szintek alacsonyabbak fluvasztatin szedése mellett. Proteinuriás T2DM betegeknél az alfa-1-gátló doxazozin kezelés immunmoduláns hatású. Rossz anyagcserekontroll mellett a hiperurikémiás T2DM betegeknél a standard allopurinol kezelés hatására csökken a HbA1C szint.

Disszertáció témájában megjelent közlemények

1. Mácsai E.; Vásárhelyi B.; Madácsy L. (2005) Újabb adatok a diabéteszes nefropátia molekuláris patogenezisének kutatásában. *MBA* (58.): 91-97.
2. Mácsai E.; Széll J.; Ladányi E.; Treszl A.; Vásárhelyi B.; Madácsy L. (2007) Kardiális biomarkereket meghatározó tényezők vizsgálata diabéteszes és nem diabéteszes hemodializált betegekben. *Orv Hetil* (11): 483-488.
3. Mácsai E.; Mizsik T.; Fodor B.; Ladányi E.; Treszl A.; Vásárhelyi B. (2007) Kardiális biomarkerek szintjét befolyásoló tényezők hemodializált diabéteszes betegekben : a fluvastatin hatása *MBA* (62.): 149-153.
4. Mácsai E.; Fodor B.; Fekete A.; Treszl A.; Vásárhelyi B.; Madácsy L. (2007) Befolyásolja-e a diabétesz hemodializált betegekben a citokin-szinteket? *Hypert és Nephrol.* (11.): 21-26.
5. Mácsai E.; Fodor B. (2008) Van-e kapcsolat a szérum MCP-1 és a dokumentált diabéteszes szövődmények között diabetológiai ambulancián gondozott betegekben? *Hypert és Nephrol.* 12 (5):184-188.
6. Mácsai E.; Cseh Á.; Budai G.; Mészáros G.; Vásárhelyi B.; Fischer K.; Szabó A.; Treszl A. (2009) Effect of 3 months of doxazosin therapy on T-cell subsets in type 2 diabetic patients *J Int Med Res* 37(6):1982-1987. **IF: 0,90**
7. Mácsai E.; Vásárhelyi B.; Madácsy L. (2010) A kardiovaszkuláris morbiditást befolyásoló

- tényezők diabéteszes nefropátiában.
Metabolizmus (2): 90-92.
8. Mácsai E; Joó I, Pavelka R, Eisenbergerné K.A, Tódorné R.M, Vásárhelyi B, Madácsy L. (2011) Az allopurinol kezelés helye a kardiometabolikus rizikó csökkentésében Metabolizmus 9(3): 37-40.
 9. Mácsai E., Benke A., Cseh Á., Vásárhelyi B. (2012) Factors influencing skin autofluorescence of patients with peritoneal dialysis Acta Physiol Hung 99(2):216-222. **IF:0,82**
 10. Mácsai E., Tölgyesi K., Benke A.(2012) A diabetes mellitus és a peritoneális dialízis kapcsolata LAM 22(02): 129-133.
 11. Mácsai E. (2012) A bőr autofluoreszcenciájának mérése a diabetológiai és klinikai gyakorlatban Orv Hetil 153(42):1651-1657.
 12. Mácsai E., Takáts Z., Derzbach L., Körner A., Vásárhelyi B. (2013) Verification of skin autofluorescence values by mass spectrometry in type-1 diabetic adolescents Diabetes Technol Ther 15(3):269-72. **IF 1,93**

A PhD témájától független publikációk

13. Mácsai E; Szabó E; Király M; Benke A; Lakatos L. (2011) A HbA1c-szint összehasonlítása nem diabetezes és diabetezes betegcsoportok között nefrológiai ambulancián Hypert és Nephrol 15(2):67-73.
14. Mácsai E. (2012) A diabetes mellitus kezelésének speciális szempontjai idős korban LAM 22(03):205-209.
15. Mácsai E., Vizeliné S. K., Tölgyesi K., Benke A. (2012) Hogyan kerülhetjük el a hypoglykaemiát hemodializált diabetezes betegek inzulinkezelése során? LAM 22(6-7):429-433.
16. Mácsai E., Benke A., Gergely L., Vándorfi Gy. (2012) A szénhidrát anyagcsere korrekciója előrehaladott veseelégtelenségben Diab Hung 20(4):256-262.
17. Toldi G.; Bekő G.; Kádár G.; Mácsai E.; Kovács L.; Vásárhelyi B.; Balog A. (2012) Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in the assessment of inflammatory activity of rheumatoid arthritis patients in remission. Clin Chem Lab Med. 51(2):327-32.
IF: 2,15

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Vásárhelyi Barna professzor úrnak, akinek vezetése mellett 2005-től a tudományos munkámat végezhettem. Madácsy László professzor úr támogatott a kutatással kapcsolatos törekvéseimben és terveimben. Szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinika Kutató Laborjában dolgozó valamennyi munkatársnak, a PhD hallgatóknak és az asszisztenseknek a mérések elvégzésében nyújtott segítségét.

A hemodializált diabéteszes és nem diabéteszes betegekkel kapcsolatos tevékenységem engedélyezésért köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ladányi Erzsébet orvos igazgató asszonynak és Zoltán György igazgató úrnak. A hemodializált betegek echokardiográfiás paramétereinek elemzésében Dr. Csótay Anikó segítségét köszönöm. A citokin-mérések elvégzéséért a DEOEC III Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában Sipka Sándor professzor úr és Dr. Lakos Gabriella együttműködésért tartozom köszönettel. Külön szeretném megköszönni Dr. Fodor Bertalan laborvezető úr segítségét és baráti tanácsait.

A peritoneálisan dializált betegekkel kapcsolatos felmérés engedélyezéséért Horn Péter vezérigazgató úrnak és Dr. Benke Attila orvos igazgató úrnak szeretném köszönetemet kifejezni. A mérések gyakorlati kivitelezésében nyújtott segítségükért szeretném megköszönni Tölgyesi Katalin vezetőápoló és a BBRAUN Dialízishálózat PD orvosainak és nővéreinek együttműködését.