

**A FOLYAMATOS CUKORMONITOROZÁS, AZ OXIDATÍV
STRESSZ ÉS AZ ENDOTÉLDISZFUNKCIÓ KLINIKAI ÉS
EXPERIMENTÁLIS VIZSGÁLATA**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Tamaskó Mónika

Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar
Egészségtudományi Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Dr. Kriszbacher Ildikó

Témavezető: Prof. Dr. Sulyok Endre

Pécs, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Összefoglalás	6
3. Folyamatos intersticiális cukormonitorozással (CGMS) javítható a glikémia diabéteszes betegekben	9
3.1. Bevezetés	9
3.1.1 A glikémiás kontroll	9
3.1.2. Vénás plazmaglükóz, hemoglobin A _{1c} (HbA _{1c}) és a fruktózamin (frukt) mérése	11
3.1.3. Vércukor önellenőrzés	13
3.1.4. A folyamatos cukormonitorozás lehetőségei	14
3.1.4.1. A CGMS készülék	15
3.2. Célkitűzések	17
3.3. Betegek és módszerek	18
3.4. Eredmények	20
3.5. Megbeszélés	26
4. Az oxidatív stressz monitorozásának lehetséges új módszere: a hidrogén-peroxid (H₂O₂) amperometriás elven való mérése inaktivált glükóz-szenzor segítségével	33
4.1. Bevezetés	33
4.1.1. A reaktív oxigén származékok (ROS)	33
4.1.2. Diabétesz mellitusz és a reaktív oxigén származékok	35
4.1.3. A hidrogén-peroxid (H ₂ O ₂)	38
4.1.4. A H ₂ O ₂ detektálás lehetőségei	40
4.2. Célkitűzések	42
4.3. Kísérleti körülmények	42
4.3.1. Eszközök, módszerek	42
4.3.2. Vegyszerek	43
4.3.3. Állatkísérletek	44
4.4. Eredmények	45

4.5. Megbeszélés	56
5. A dohányzás endotél diszfunkciót okozó hatásának vizsgálata endotélsejteken	60
5.1. Bevezetés	60
5.1.1. Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz enzim (eNOS) és a nitrogén-monoxid (NO)	60
5.1.2. Dohányzás okozta oxidatív stressz és endotél diszfunkció	61
5.1.3. A redukált glutation (GSH)	62
5.2. Célkitűzések	63
5.3. Anyagok és módszerek	64
5.4. Eredmények	65
5.5. Megbeszélés	70
6. Végtagi gangrénát okozó kalcifilaxis hasnyálmirigy-vese transzplantáción átesett betegünkénél; a fetuin lehetséges szerepe	72
6.1. A kalcifilaxis	72
6.2. Esetismertetés	73
6.3. Megbeszélés	75
7. Tézisek	78
8. Irodalomjegyzék	80
9. A szerző publikációi	87
10. Köszönetnyilvánítás	96

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGE	advanced glycation endproduct (előrehaladott glikációs végtermékek)
Ahsg	alpha-2 Heremans Schmid glikoprotein (fetuin A)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
AUC	area under curve (görbe alatti terület)
BMI	body mass index (testtömegindex)
BSA	bovine serum albumin (marha szérumalbumin)
cAMP	ciklikus adenozin-5'-monofoszfát
cGMP	ciklikus guanozin-5'-monofoszfát
CGMS	Continuous Glucose Monitoring System (folyamatos cukormonitorozó készülék)
Cu-Zn-SOD	réz-cink-szuperoxid-dizmutáz
DFP	dohányfüst puffer
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintáz
ESR	elektron spin rezonancia
Fe	vas
FRET	fluoreszcens rezonancia energiatranszfer
frukt	fruktózamin
G6PDH	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GSH	redukált glutation
HbA _{1c}	hemoglobin A _{1c}
HDL	high density lipoprotein
HO [•]	hidroxil-gyök
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HOMA	homeostasis model assesment
IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
ISI	insulin sensitivity index (inzulin érzékenységi index)
JNK	c-jun N-terminal kináz
MGP	mátrix Gla protein
mRNS	messenger RNS

Mn-SOD	mangán-szuperoxid-dizmutáz
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NF-κB	nuclear factor-κB
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NUC	non-uremic calciphylaxis (nem urémiás kalcifilaxis)
O ₂ ^{•-}	szuperoxid-anion
•OH	hidroxil-gyök
PBS	phosphate buffer solution (foszfát puffer oldat)
PeT	fotonindukálta elektron transzfer
PK	protein kináz
p38 MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
RNS	reactive nitrogen substrate (reaktív nitrogén származék)
ROS	reactive oxygen substrate (reaktív oxigén származék)
ROO [•]	peroxil-gyök
SDS PAGE	sodium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SEM	standard error of the mean (az átlag standard hibája)
Ser	szerin
sGC	szolubilis guanilát cikláz
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SSA	sulfosalicylic acid (szulfoszalicilsav)
Thr	threonin
TNF-alfa	tumor nekrosis faktor alfa
VEGF	vascular endothelial growth factor (érendotél eredetű növekedési faktor)

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a 2-es típusú diabétesz mellitusz egyre kifejezettebb térhódításának vagyunk szemtanúi. A kezelési lehetőségek fejlődésének következtében a betegek leggyakoribb halálukai ma már a kardiovaszkuláris szövődmények. Az érrendszer károsodása már a diabéteszt megelőző állapotok kifejlődésekor elkezdődik és mindvégig progresszív marad. Emiatt napjainkban a diabetológia egyik legnagyobb kihívása a kardiovaszkuláris szövődmények megelőzése és progressziójának lassítása. Munkám során egyrészt a folyamatos cukormonitorozáson alapuló személyre szabott terápiának a jobb glikémiás kontroll és ezáltal a szövődmények rizikójának csökkentésében betöltött szerepét vizsgáltam. Emellett a vaszkuláris szövődmények háttérében álló oxidatív stressz monitorozásának lehetőségét, és az érszövődmények major rizikófaktorának számító dohányzás endotéldiszfunkciót okozó hatásának mechanizmusát mutattam ki. Esettanulmányom pedig egy másik vaszkuláris szövődmény, a kalcifilaxis irreverzibilis és progresszív voltát mutatja be.

Diabéteszes betegeknél terápiás célunk a szoros glikémiás kontroll, a szénhidrát-anyagcsere célértékeinek elérése. A szoros glikémiás kontroll óhatatlanul együtt jár a hipoglikémiák számának emelkedésével, melyek jól ismert negatív hatásuk miatt prognosztikai szempontból kedvezőtlen hatásúak. Emiatt számos körülményt figyelembe véve igen fontos az egyénre szabott terápiás célok és glükometabolikus célértékek meghatározása. A vércukorszint-ingadozások a diabétesz szövődményeinek kialakulásában központi szerepet játszanak, így ezek kimutatása igen nagy jelentőséggel bír. Azonban a betegek által végzett rendszeres vércukor önellenőrzés mellett jelentősebb vércukorszint-ingadozások is rejtve maradhatnak. A megoldást a glükóz-szenzorok kifejlesztése és a folyamatos cukormonitorozás bevezetése jelentette. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a Continuous Glucose Monitoring System (CGMS) az ujjbegyi méréseknél lényegesen pontosabban jelzi a vércukorszint ingadozásait és kifejezetten alkalmas az aszimptomás hipoglikémiák kimutatására is. A monitorozással kimutatott cukorszint-ingadozási tendenciák alapján végzett terápiamódosítás a szénhidrát anyagcsere javulását eredményezte. Eredményeink megerősítették, hogy a folyamatos cukormonitorozás nagy segítséget jelent a személyre szabott terápia, az individuális glikémiás kontroll kialakításában és egyben az anyagcsereállapot javításában.

A reaktív oxigén származékok (ROS) számos fiziológiás és patológiás folyamatban betöltött központi szerepük miatt az utóbbi időben a kutatók érdeklődésének középpontjába

kerültek. A hidrogén-peroxid (H_2O_2) egy viszonylag stabil ROS, mennyisége az emberi szervezetben néhány $\mu\text{mol/l}$ -re tehető. A CGMS készülék glükóz-szenzorának működési elvét ismerve felmerült bennünk a kérdés, vajon a szenzor enzimaktivációt követően alkalmas lehet-e a H_2O_2 -szint mérésére. Vizsgálataink során a glükóz-oxidáz enzim fehérje-precipitáló ágenssel történő inaktivációját követően létrehoztunk egy H_2O_2 -szenzort, mely in vitro körülmények között alkalmasnak bizonyult a H_2O_2 -szint szelektív, szenzitív és megbízható mérésére. Az alsó méréshatár körülbelül $5\mu\text{mol/l}$. Antioxidáns kapacitással bíró biológiai mintákban végzett méréseink során a létrehozott szenzor alkalmas volt a minták antioxidáns működésének kimutatására. A H_2O_2 -szenzorral a sikeres in vitro mérési eredmények ellenére in vivo körülmények között sajnos egyelőre nem sikerült megbízható mérést kiviteleznünk. Az általunk elsőként létrehozott H_2O_2 -szenzor további vizsgálatokat és a szenzor megfelelő átalakításait követően reményeink szerint alkalmas lehet a H_2O_2 -szint folyamatos in vivo detektálására.

A dohányzás okozta endotél-diszfunkció patomechanizmusának kutatása a Pécsi II. sz. Belgyógyászati Klinikán hosszú múltra tekinthet vissza. Régóta ismert, hogy a dohányzás a nitrogén-monoxid (NO) termelésének és biológiai hozzáférhetőségének csökkentése révén vezet az endotél-függő vazodilatáció károsodásához, melynek pontos mechanizmusa ezidáig ismeretlen volt. Az endoteliális NO termelés többek között az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz enzim (eNOS) posttranszlációs modifikációjától is függ, melyet számos egyéb faktor mellett az enzim többszörös foszforilációja befolyásol. Egér endotélsejteken végzett kísérleteinkkel - dohányfüst-pufferrel rövid ideig történő inkubációt követően - elsőként sikerült igazolnunk, hogy az eNOS foszforilációjának gátló irányba történő eltolódása vezet az eNOS aktivitásának és következményesen az NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenéséhez. A dohányfüst-puffer ezen hatása az antioxidáns hatású redukált glutationnal (GSH) kivédhető volt. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a dohányfüst az eNOS foszforilációs szabályozásának komplex befolyásolásán keresztül már rövid távon csökkenteni képes az NO biológiai hozzáférhetőségét, ezáltal az endotél dependens vazodilatációt, ami igen jelentős tényező a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában és progressziójában egyaránt.

A kalcifilaxis ritka kórkép, leggyakrabban urémiás és diabéteszes betegeknel fordul elő. Az utóbbi időben több közlemény foglalkozott a normál vesefunkció mellett kialakult úgynevezett nem urémiás kalcifilaxis (non uremic calciphylaxis, NUC) kérdésével. Esetbemutatásunkkal az irodalomban elsőként tettünk említést hasnyálmirigy-vese transzplantáció után, a diabétesz és az urémia klinikai remissziójának fázisában kalcifilaxis megjelenéséről. Betegünk esetével szeretnénk felhívni a figyelmet arra, hogy diabéteszes

betegeknél a sikeres hasnyálmirigy-vese transzplantáció csak látszólagos remissziót hoz, az érrendszer korábban elkezdődött károsodása irreverzibilis és progresszív marad.

3. FOLYAMATOS INTERSTICIÁLIS CUKORMONITOROZÁSSAL (CGMS) JAVÍTHATÓ A GLIKÉMIA DIABÉTESZES BETEGEKBEN (V,VI)

3.1 Bevezetés

3.1.1. A glikémiás kontroll

Glikémiás kontrollon a szénhidrát-anyagcsere aktuális állapotát értjük, melynek megítéléséhez több paraméter egyidejű értékelése szükséges. Új keletű elnevezéssel „glikémiás triászról” beszélünk és a glükometabolikus-állapotot együttesen jellemző mutatók, úgymint az éhomi és a posztprandiális vércukorszint és a legelterjedtebben használt hosszú távú anyagcsere-paraméter a hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) közös elnevezéseként használják (1). A posztprandiális vércukorszint az étkezés után másfél órával mért vércukorértéket jelenti.

A diabétesz kezelésének célja a megfelelő glikémiás kontrollra való törekvés és ennek részeként a szénhidrát-anyagcsere paraméterek célértékeinek elérése. A glikémiás célértékektől való eltérés önmagában a makro-, és mikrovaszkuláris szövődmények major rizikófaktora, így a célértékre történő kezelés során a vaszkuláris kockázat csökkentését tartjuk szem előtt. Napjainkban a cukorbetegség hosszú távú prognózisát ezen mikro-, és makroangiopátiás szövődmények határozzák meg. Ismert, hogy míg a diabétesz-specifikus mikroangiopátiás szövődmények nem aterogén eredetűek és elsősorban a glikémiás kontroll függvényei, addig a makrovaszkuláris szövődmények kialakulásában a nem megfelelő glikémiás kontroll a patomechanizmusnak csak az egyik összetevője. A makroangiopátiás szövődmények megjelenésében a hipertónia, vérzsír eltérések, a prokoaguláns hatások fölerősödése, a citokinek megváltozott termelődése is hasonlóan jelentős szerepet játszik. A szénhidrát-anyagcsere károsodása, a magas vérnyomás és a vérzsír eltérések ugyanazon célszervre, az endotélre fejtik ki kedvezőtlen hatásukat, így akármelyik tényezőnek az alacsony kardiovaszkuláris kockázatot jelző célértéktől való kisebb eltérése is jelentős kockázatfokozódást jelent (1,2,3,4,5,6,7).

Korábbi ajánlások a szénhidrát-anyagcsere tekintetében alacsony, makroangiopátiás valamint makro-, és mikroangiopátiás kockázati értékeket különböztettek meg (1). Mivel a 2-es típusú diabétesz és a mikro-, vagy makroangiopátiával szövődött 1-es típusú diabétesz önmagában is a nagy kardiovaszkuláris kockázatu állapotokhoz tartozik, a legújabb ajánlások már csak a kardiovaszkuláris kockázatot nem, vagy alig fokozó célértékek, az úgynevezett közel normoglikémiás kezelés célértékeinek figyelembe vételét ajánlják. Így glikémiás célértékek tekintetében nincs különbség a különböző kardiovaszkuláris kockázatu

betegcsoportok között (1. táblázat) (3). A tartósan közel normoglikémiára való törekvés mikrovaszkuláris szövődményeket csökkentő hatását az 1-es típusú cukorbetegségeken végzett Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) meggyőzően megerősítette (4). A makrovaszkuláris szövődmények szempontjából a szoros glikémiás kontroll szerepe sokáig vitatott volt és számos vizsgálat tárgyát képezte. A legmeggyőzőbben azonban a UKPDS vizsgálat 10 éves utánkövetésének adatai igazolták a szoros glikémiás kontroll nagyér-szövődményekre kifejtett relatív kockázatcsökkentő hatását. Igazolást nyert, hogy a célértéket meghaladó minden vércukortartomány fokozza mind a kis-, mind a nagyér-szövődmények kockázatát (5,6).

1.táblázat: A szénhidrát-anyagcsere kezelési célértékei felnőttkori cukorbetegségben, nem terhes állapotban (Átvéve módosítással: Útmutató/Anyagcsere-Endokrinológia. Klinikai Irányelvek Kézikönyve, 2010)

HbA_{1c} (%)	< 6,5 (1-es típusú diabétesz) < 7,0 (2-es típusú diabétesz)
éhomiai plazma glükóz (mmol/l)	
laboratóriumi mérés	< 6,0
önkontrollos mérés	< 5,5
Étkezés utáni (1,5 h) plazma glükóz (mmol/l)	
laboratóriumi mérés	< 7,5
önkontrollos mérés	< 7,5

A szoros glikémiás kontroll kardiovaszkuláris kockázatot csökkentő hatása azokban a vizsgálatokban nem igazolódott, melyekbe idősebb, hosszabb ideje fennálló diabéteszes, már érrendszeri szövődményekkel bíró betegek kerültek bevonásra. Ismert, hogy a szigorú célértékekre törekvő kezelés negatív hatása részben a következményes hipoglikémiákban keresendő. A célértékek elérése ugyanis alig képzelhető el hipoglikémia előfordulása nélkül. Hipoglikémiáról akkor beszélünk, ha a vércukorszint 3 mmol/l alá csökken. Az állapotot általában jellegzetes klinikai tünetek kísérik. A tünetmentes hipoglikémiát biokémiai hipoglikémiának nevezzük, autonóm diabéteszes neuropátiás betegeknél gyakran előfordul. Enyhébb tünetek esetén hipoglikémiás epizódról beszélünk, ilyenkor a beteg az állapotot szénhidrát-bevitellel korrigálni képes. A súlyos hipoglikémia kezelése külső segítséget igényel. A hipoglikémia neuropszichiátriai, mentális eltéréseket, valamint EKG-eltéréseket

(QT-szakasz megnyúlása, malignus kamrai ritmuszavarok) és akár hirtelen halált is okozhat, így további jelentős kardiovaszkuláris kockázat-növekedést eredményez. A leginkább veszélyeztetettek a már kardiovaszkuláris szövődménnyel rendelkező betegek. A glikémiás célértékek kevésbé szigorú betartása megengedhető, sőt előnyös hatású idősebb, régóta fennálló diabéteszes betegeknél, többszörös társbetegségek és előrehaladott érrendszeri szövődmények fennállása esetén (5,6,7). Ugyanakkor bizonyos esetekben, egyénre szabottan a javasoltnál szorosabb célértékek is meghatározhatók. Így mai tudásunk szerint célszerűbb glikémiás célértékek helyett glikémiás céltartományokról beszélni. Gondozásunk során igen fontos az egyénre szabott glikémiás célértékek meghatározása.

3.1.2. Vénás plazma glükóz, hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) és a fruktózamin (frukt) mérése

A vénás plazma glükóz értéke a pillanatnyi anyagcsere-állapotot tükrözi. A diabétesz és a diabéteszt megelőző állapotok diagnosztikájának alapját képezi, ezen túlmenően időszakos mérése manifeszt cukorbetegéknél is fontos a szénhidrát-háztartás ellenőrzésére. A glikémiás kontroll megítéléséhez az úgynevezett „glikémiás triász”, azaz a vénás plazmából enzimatis laboratóriumi módszerrel meghatározott éhomi és posztprandiális vércukorérték, valamint a HbA_{1c} meghatározása szükséges. Az Európai Diabétesz Társaság (EASD) és az Európai Kardiológiai Társaság (ESC) a kardiovaszkuláris betegségek, a diabétesz és a diabéteszt megelőző állapotok kezelésével kapcsolatban a „glikémiás triász” egészének figyelembevételét hangsúlyozza (2,3).

Sokáig vitatott kérdés volt, hogy az éhomi vagy a posztprandiális vércukorszint a nagyobb jelentőségű. A diabétesz szövődményeinek kialakulása szempontjából a vércukorszint étkezéssel összefüggő ingadozásai központi jelentőségűek (1,3,7). Viszont emelkedett éhomi vércukorérték esetén a posztprandiális vércukorértékek normalizálására irányuló próbálkozás hiábavaló, az éhomi vércukorszint normalizálása pedig a posztprandiális vércukorszint csökkenését is eredményezi. Monnier vizsgálata kimutatta, hogy mérsékelt HbA_{1c} emelkedés esetén a glikémia 30%-áért az éhomi, 70%-áért a posztprandiális vércukorszint felelős, míg jelentősen emelkedett HbA_{1c} érték esetén éppen fordított arányú a részesedésük a glikémiás státusz alakításában (2). Az éhomi és a posztprandiális vércukorszint célértéke 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben azonos (3).

A HbA_{1c} és a fruktózamin (frukt) a hosszabb távú szénhidrát-anyagcserét jellemző paraméterek. Elsőként 1958-ban Huisman és munkatársainak sikerült a HbA_{1c}-t az egyéb hemoglobin-formáktól elkülöníteni oszlopkromatográfia segítségével (8). A HbA_{1c} a

hemoglobin globin alkotórészének β -láncán található N-terminális aminosav irreverzibilis, nem enzimatis glikációja során képződik, szintje a perifériás vér átlagos vércukorszintjének megfelelően változik (9). Mivel a vörösvértesteken belül található - melyek életideje maximum 120 nap - a megelőző 8-12 hét szénhidrát-anyagsere állapotát tükrözi. Laboratóriumi mérésére a nagynyomású folyadék kromatográfias eljárás (high-pressure liquid chromatography, HPLC) az elfogadott módszer (9,10). Az immunológiai módszerrel történő meghatározás sokkal specifikusabb, ezáltal általában alacsonyabb HbA_{1c} szintet detektáló eljárás.

A HbA_{1c} meghatározást számos kór állapot befolyásolja. A fokozott csontvelői vörösvértest-képzéssel és megrövidült élettartammal járó anémiák (hemolitikus, sarlósejtes anémia) esetén egy alulbecsült, míg a csökkent vörösvértest-képzéssel és ezáltal hosszabb élettartammal járó hiányállapot-anémiák esetén a valósnál magasabb HbA_{1c} értéket kapunk. Policitémia vera esetén és splenectomia után a valósnál magasabb, míg vörösvértest szuszpenzió adását követően és hemodializált betegeknél alulbecsült HbA_{1c} érték mérhető (9). Végstádiumú veseelégtelenségben a hemoglobin és a karbamid nitrogén reakciója során képződő carbamoyl-hemoglobin a mért HbA_{1c} értéket növeli. Hipertrigliceridémia, lipémiás szérumminta esetén a HbA_{1c} mérés szintén nem megbízható, a valósnál magasabb értéket ad. A különböző hemoglobinopátiák is jelentősen meghamisíthatják méréseinket (9).

Az antioxidáns hatású E-vitamin a nem enzimatis glikáció gátlása révén a HbA_{1c} értékét csökkenti (11). Diabéteszes betegeknél a HbA_{1c} instabil előalakjának számító aldimin a detektált HbA_{1c} mennyiségének akár 30%-át is kiteheti, ezáltal jelentősen túlbecsült értéket adva (12).

A DCCT és a UKPDS 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben egyaránt megerősítette a HbA_{1c}-szint és a diabétesz hosszú távú szövődményei közötti szoros összefüggést (4,6). A HbA_{1c} kezelési célértéke 2-es típusú diabéteszben 7%, 1-es típusú diabéteszes betegeknél 6,5% (az Amerikai Diabétesz Társaság legújabb ajánlása szerint célértéke 1-es típusú cukorbetegség esetén is 7%) (7). Több vizsgálat foglalkozott az ennél szigorúbb célértékek későbbi makro-, és mikrovaszkuláris szövődmények kialakulására gyakorolt hatásával. A vizsgálatok nem hoztak egységes eredményt, és egyértelműen a célértékek személyre szabott alkalmazását és szigorú célértékek helyett inkább kezelési céltartományok figyelembe vételének jelentőségét erősítették meg.

A frukt értéke a szérum teljes glikált fehérje-mennyiségét jelzi, melynek legnagyobb részét a glikált albumin teszi ki. Értékét nem befolyásolják a HbA_{1c}-mérést zavaró tényezők és a HbA_{1c}-nél jobban jelzi a vércukorszint rövidebb távú ingadozásait. A frukt szintjét

ugyanakkor a szérum fehérjetartalma, valamint a húgysav és a bilirubin befolyásolja (13). A frukt mérés mellett lehetőség van a glikált albumin mérésére is, melynek szintje a zavaró tényezőktől még inkább független. A frukt és a glikált albumin meghatározása nem képezi a rutinszerű glikémiás kontroll részét, leginkább a HbA_{1c}-mérést zavaró kórállapotok, terhesség és gyors terápia-módosítást igénylő esetekben javasolt az alkalmazása (2,13).

Az 1,5-anhydroglucitol a vese glomerulusokban történő filtrációt követően a vesetubulusokban a glükózzal együtt reabszorbeálódik, a glükóz-transzporterekhez való kötődése azonban a glükóznál gyengébb. Emiatt hiperglikémia esetén reabszorpciója és így következményes plazmaszintje csökken, melynek értéke a megelőző 10-14 nap glikémiás állapotát jelzi (14).

3.1.3. Vércukor önellenőrzés

A laboratóriumi módszerekkel történő vércukor-ellenőrzés és HbA_{1c} meghatározás mellett kiemelt jelentőségű a betegek által végzett rendszeres ujjbegyi vércukormérés. Bevezetése mérföldkőnek számít a diabetológia történetében, mivel a diabétesz hatékonyabb kezelését teszi lehetővé. A betegek ezzel a módszerrel önmaguk ellenőrizni tudják az alkalmazott kezelés hatékonyságát és szükség esetén kisebb korrekciókat tudnak végrehajtani. Az ujjbegyi kapilláris vérből a glukométerek egy része glükóz-oxidáz enzimreakciót követően reflektó-fotometriás módszerrel, másik része pedig elektrokémiai bioszenzorok segítségével határozza meg az aktuális vércukorértéket. Az alacsonyabb vércukorértékek mérésénél a reflektó-fotometriás módszer megbízhatóbb (2). Fontos kiemelni, hogy a kapilláris vérből mért vércukorértékek általában 1 mmol/l-rel alacsonyabbak a vénás plazma glükóz értékeknél.

A vércukor-önellenőrzés célja a hipo-, és hiperglikémiás anyagcsere-kisiklások megelőzése és korrekciója, a kezelés aktuális élethelyzethez való alakítása, ezáltal az optimális anyagcsere-ellenőrzés biztosítása. A módszer a betegedukáció igen hatékony eszköze (1,3). A vércukor-önellenőrzés szükségessége 1-es típusú inzulinnal kezelt cukorbetegség esetén vitathatatlan (1), azonban nem inzulinnal kezelt 2-es típusú cukorbetegségknél, rendezetlen szénhidrát-anyagcsere esetén is igazoltan hozzájárul a jobb glikémiás kontroll eléréséhez és ezáltal a későbbi szövődmények megelőzéséhez (15).

Az ujjbegyi vércukormérések módját és gyakoriságát – alkalmi mérések, étkezéshez viszonyított vércukorpárok, teljes napi vércukorprofil – az aktuális anyagcserehelyzet, az antidiabetikus kezelés, a hipoglikémia-kockázat, valamint terápiás céljainknak megfelelően

személyre szabottan kell meghatározni (3,15).

A betegek által a legjobb esetben naponta 4-8 alkalommal végzett ujjbegyi vércukormérések csak korlátozott információt nyújtanak a tényleges napi vércukorprofilról, ezáltal jelentősebb ingadozások is rejtve maradhatnak (16). A vércukorszint-ingadozások – leginkább a poszprandiális vércukorszint-kiugrások - a diabétesz szövődményeinek kialakulásában központi szerepet játszanak, így ezen ingadozások kimutatása igen nagy jelentőséggel bír.

3.1.4. A folyamatos cukormonitorozás lehetőségei

Különösen az intenzív-konzervatív inzulinkezelésben részesülő cukorbetegknél elengedhetetlenül fontos a glikémiás állapot minél szorosabb ellenőrzése. Mivel mind a laboratóriumi glikémiás paraméterek, mind a betegek által végzett otthoni vércukor-önellenőrzés alapján a vércukorszint jelentős ingadozásai is rejtve maradhatnak, korán felmerült a folyamatos vércukor-monitorozás igénye. Mindez igen széles körű kutatásokat indított el és számos kevésbé sikeres próbálkozás után a nagy áttörést a glükóz-szenzorok kifejlesztése jelentette. Ezek segítségével akár több napon keresztül gyakorlatilag folyamatosan, a nap 24 órájában monitorozható a betegek szénhidrát-anyagcseréje. A készülékek intersticiális glükózsztintet mérnek, így indirekt vércukorszint-meghatározást biztosítanak, a két érték azonban igazoltan igen jól korrelál egymással (17,18).

A bioszenzor-technológia folyamatos fejlődésének eredményeként először az 1980-as években tettek említést in vivo implantálható glükóz-szenzorokról. 1996-ban elsőként a MiniMed Medtronic cég (Northridge, CA) kezdett glükóz-szenzorával klinikai vizsgálatokat végezni, és készülékük 1999-ben CGMS néven került forgalomba (19).

2001-ben egy reverz iontoforézis elvén működő készülék, a Cygnus Inc. (Redwood City, CA) által kifejlesztett GlucoWatch Biographer jelent meg a piacon. A karóra formátumú készülék igen kis áramerősség segítségével az intersticiális folyadék bőrön keresztüli extrakcióját végezte, majd egy glükóz-szenzor segítségével határozta meg a folyadékminták glükóztartalmát. A mérési eredmények a készülékről folyamatosan leolvashatók voltak. A módszert zavaró tényezők (pl. verejtékezés) miatti pontatlansága és a bőrirritáció gyakorisága miatt kivonták a forgalomból (19).

A későbbiekben mikrodialízis technikával működő folyamatos glükóz-monitorokat is kifejlesztettek. A Menarini Diagnostics (Florence, Italy) által létrehozott GlucoDay és a Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) által kifejlesztett SCGM (subcutaneous continuous

glucose monitor) az intersticiális folyadékot egy bőr alá implantált mikrodializáló rendszer segítségével juttatja el a testen kívül található glükóz-szenzorig. A készülékek előnye, hogy egyszeri külső kalibrációt igényelnek és percenként real-time mérési eredményeket szolgáltatnak. Hátrányuk viszont a nagy méretük és a hosszú dializáló katéter, amely miatt az intersticiális folyadék lassan (körülbelül 30 perc alatt) éri el a glükóz-szenzort. Alkalmazásuk nem terjedt el (19).

3.1.4.1. A CGMS készülék

A klinikai gyakorlatban leginkább elterjedt folyamatos cukorszint-monitorozó készülékek a MiniMed Medtronic által kifejlesztett CGMS és ennek továbbfejlesztett változatai. Az első CGMS készülék 1999-ben került forgalomba. A készülék előnye a viszonylag hosszú mérési időtartam (3-5 nap) és a nagyfokú megbízhatóság és pontosság. Hátránya egyrészt, hogy az aktuálisan mért cukorszint a beteg által nem látható, azaz a készülék nem real-time üzemmódban működik, másrészt rendszeres kalibrációt igényel ujjbegyi vércukormérések alapján.

A CGMS készülék 4 fő alkotórészből áll: a hasbőr alá beültethető glükóz-szenzor, a cukormonitor-készülék, a vezeték és a számítógéphez csatlakoztatható adatletöltő egység (*1. ábra*). A készülék a glükóz-szenzor segítségével több napon keresztül képes gyakorlatilag folyamatosan mérni az intersticiális folyadék glükózszintjét. A szenzor glükóz-oxidáz enzimet tartalmaz és mikroelektrodként működik. A glükóz-oxidáz enzim glükózból és oxigénből hidrogén-peroxidot (H_2O_2) képez, mely az elektród felületét borító, H_2O_2 -re szelektív méretkizárásos rétegen keresztül az elektród felületéhez diffundál. Az elektród felületén végbemenő elektrokatalitikus bomlás során képződő elektronok detektálható áramjelet adnak, melynek nagysága az intersticiális folyadék glükózszintjével arányos (*2. ábra*). Az áramjelet a cukormonitor készülék a memóriájában tárolja. A készülék 10 másodpercenként végez méréseket, melyeket 5 percenként átlagol, ezért a mérés csak gyakorlatilag tekinthető folyamatosnak. Mérési tartománya 2 és 22 mmol/l közötti (21).

A szenzorok enzimentartalmuk miatt adott lejáratú idővel rendelkeznek, amelyen túl nem használhatók fel. Élettartamukat is az enzim elhasználódásának üteme szabja meg. Irodalmi adatok szerint átlagosan 3 nap a megbízható mérési időtartamuk (21).

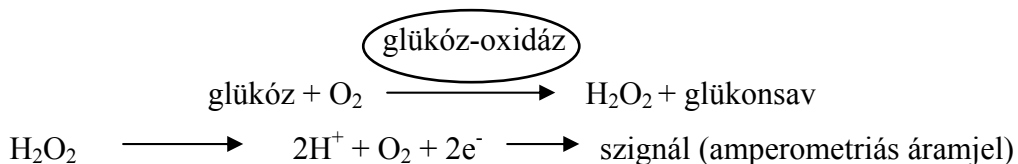
A mérési eredmények a monitorozást követően számítógépes program segítségével tölthetők le. A program a készülék memóriájában tárolt elektromos jeleket alakítja vissza glükóz-koncentrációvá mmol/l mértékegységben. Két software (MiniMed CGMS Graphs

V1.7A és a MiniMed Solutions CGMS 3.0) áll rendelkezésre az adatok letöltésére és kiértékelésére.

A készülék megfelelő működéséhez időszakos (minimálisan napi négyszeri) külső kalibrációt igényel. A betegek a monitorozás időtartama alatt legalább napi négy alkalommal ujjbegyi vércukormérést végeznek, és az így kapott külső kalibrációs vércukorértékeket maguk viszik be a készülékbe mg/dl mértékegységben. A vércukorértékek mellett úgynevezett „eseménykódokat” is rögzíteniük kell a készülékbe étkezéskor, inzulinadásakor, fizikai aktivitás esetén, illetve ha hipoglikémiát érzelnek. Az eseménykódok a grafikus regisztrátumokon kis szimbólumok formájában jelennek meg, ezáltal mutatják a fenti tényezők vércukorháztartást befolyásoló hatását.



1. ábra: A CGMS készülék felépítése



2. ábra: A CGMS készülék működésének elve

3.2. Célkitűzések

Vizsgálatunk célja a CGMS készülékkel végzett cukorszint-monitorozás előnyeinek meghatározása volt a hagyományos ujjbegyi vércukorméréshez képest. Vizsgáltuk, hogy az ujjbegyi vércukorméréshez képest a CGMS mennyivel alkalmasabb a vércukor-ingadozások kimutatására, különös tekintettel a beteg által nem észlelt hipoglikémiákra. Vizsgáltuk a CGMS készülék által mért intersticiális glükózsintek átlaga és az ujjbegyi vércukorértékek átlaga, valamint a hosszabb távú szénhidrát-anyagcserére utaló laborparaméterek (HbA_{1c}, frukt) közötti összefüggéseket. A mérési eredmények alapján elemeztük a hipo-, és hiperglikémiák gyakoriságát és tartamát is.

Feltettük a kérdést, hogy a CGMS segít-e cukorbetegknél a jobb anyagcsere-állapot elérésében. Vizsgáltuk a kezelés első CGMS monitorozás alapján végzett módosításának a betegek szénhidrát-háztartására gyakorolt hatását. Vizsgáltuk a menstruáció és egyéb tényezők – pszichés hatások, stresszhelyzet, lázas állapot - szénhidrát-háztartásra kifejtett hatását is.

Mindezek mellett tapasztalatokat gyűjtöttünk a készülék gyakorlati alkalmazhatóságáról, a szenzor élettartamáról és a betegek, valamint az egészséges kontrollok általi tolerálhatóságáról. Végül értékeltük a feldolgozáshoz alkalmazott szoftverek és az ezek segítségével nyert adatok gyakorlati alkalmazhatóságát.

3.3. Betegek és módszerek

A PTE KK II. számú Belgyógyászati Klinikán 2003. februárjától a Lilly Hungária Kft. által támogatott országos klinikai vizsgálat keretében inzulinkezelt cukorbetegéknél végeztünk protokoll szerinti, 96 órás CGMS monitorozást. Méréseinkhez a MiniMed Medtronic által kifejlesztett CGMS készüléket használtuk. A vizsgálat keretében 29 cukorbetegnél végeztünk önkontrollos monitorozást (58 mérés). Olyan, intenzív-konzervatív inzulinkezelésben részesülő cukorbetegeket vizsgáltunk, akik megfelelően edukálhatóak voltak, azonban emellett nem megfelelő glikémiás státusszal rendelkeztek. Két betegünkönél inzulinpumpa mellett végeztük a monitorozást. A betegek nagyobb része 1-es típusú (n=25), kisebb hányada 2-es típusú (n=4) cukorbeteg volt. Klinikai jellemzőik (átlag \pm SEM): életkor: $38 \pm 3,2$ év; testtömeg: $71,4 \pm 2,2$ ttkg; testmagasság: 170 ± 2 cm; testtömeg-index (BMI): $24,5 \pm 0,6$ kg/m²; szisztolés vérnyomás: 123 ± 2 Hgmm; diasztolés vérnyomás: 74 ± 2 Hgmm; HbA_{1c}: $8,44 \pm 0,34$ %; frukt: 388 ± 15 μ mol/l; össz-inzulindózis: 49 ± 3 E/nap; testtömegre vonatkoztatott inzulindózis: $0,70 \pm 0,04$ E/ttkg/nap. A kontroll CGMS monitorozásra az első mérést követően átlagosan 7,6 hónappal került sor.

A vizsgálatban résztvevő betegek a monitorozás megkezdése előtti napokban a részükre kiadott vizsgálati füzetekbe feljegyezték az otthoni ujjbegyi vércukormérések eredményeit. A legfrissebb HbA_{1c} és frukt értékeket is rögzítettük, illetve amennyiben szükséges volt, újabb laborvizsgálatot végeztünk ezek irányában.

A glükóz- szenzor behelyezése egy speciális belövő készülék segítségével történt. A behelyezés előtt egy gyári ellenállás segítségével ellenőriztük az elektromos szignál erősségét. Ennek adott érték feletti szintje a készülék alkatrészeinek megfelelő működését bizonyítja. A betegek a felhelyezés előtt igen részletes edukációban részesültek.

Ezután került sor a CGMS készülék első felhelyezésére, a glükóz-szenzor hasbőr alá történő implantációjára általában a köldök alatti területre. A behelyezés előtt fontos ellenőrizni, hogy az adott területen ne legyen inzulincsomó, heg vagy bármilyen egyéb, a mérést zavaró elváltozás. A betegek beszámolója alapján a beszúrásakor érzett fájdalom nagyon csekély, egy tűszúráshoz (pl. inzulinbeadáshoz) hasonló. A behelyezést követően került sor a készülék szenzorhoz való csatlakoztatására és az elektromos szignál nagyságának ismételt ellenőrzésére, amely már az intersticiális glükóz koncentrációjával arányos. Az elektromos szignál értéke kezdetben erősen ingadozó, emiatt a mérés megkezdése előtt egy hosszabb, 1 órás kalibrációs idő szükséges. Ez idő alatt a készülék működése még nem megbízható és nem végez méréseket. Feltehetően ez az idő szükséges ahhoz, hogy az

intersticiális folyadék a szenzor felületi rétegein átdiffundáljon, azokat kellően „átnedvesítse” így létrehozva egy egyensúlyi állapotot. A betegek 1 óra elteltével viszik be a készülékbe az első kalibrációs ujjbegyi vércukorértéket, ezzel elindítva a mérést.

Betegeink a készüléket minden esetben otthonukban, a megszokott napi aktivitásuk mellett 4 napig viselték. Ezen idő alatt naplót vezettek, melyben dokumentálták a napi négyszeri ujjbegyi vércukormérések eredményeit, összes étkezésük időpontját és szénhidrát tartalmát, az inzulinadások idejét és az inzulin dózisokat, a beteg által észlelt hipoglikémiák pontos időpontját, a kísérő tüneteket, és a hipoglikémia megszüntetésére tett kísérletet, a szénhidrábevétel mennyiségét. Betegeinket megkértük, hogy naplójukba jegyezzék fel a vércukorszintet befolyásoló egyéb tényezők fennállását (menstruáció, láz, stresszhatás, megbetegedések) valamint azt is, hogy mikor, mennyi ideig és milyen jellegű testmozgást végeztek.

A monitorozás végeztével az eredmények két különböző számítógépes program segítségével kerültek letöltésre. Az adatok kiértékelése után elvégeztük betegeinknél a szükséges terápiás illetve diétás változtatásokat.

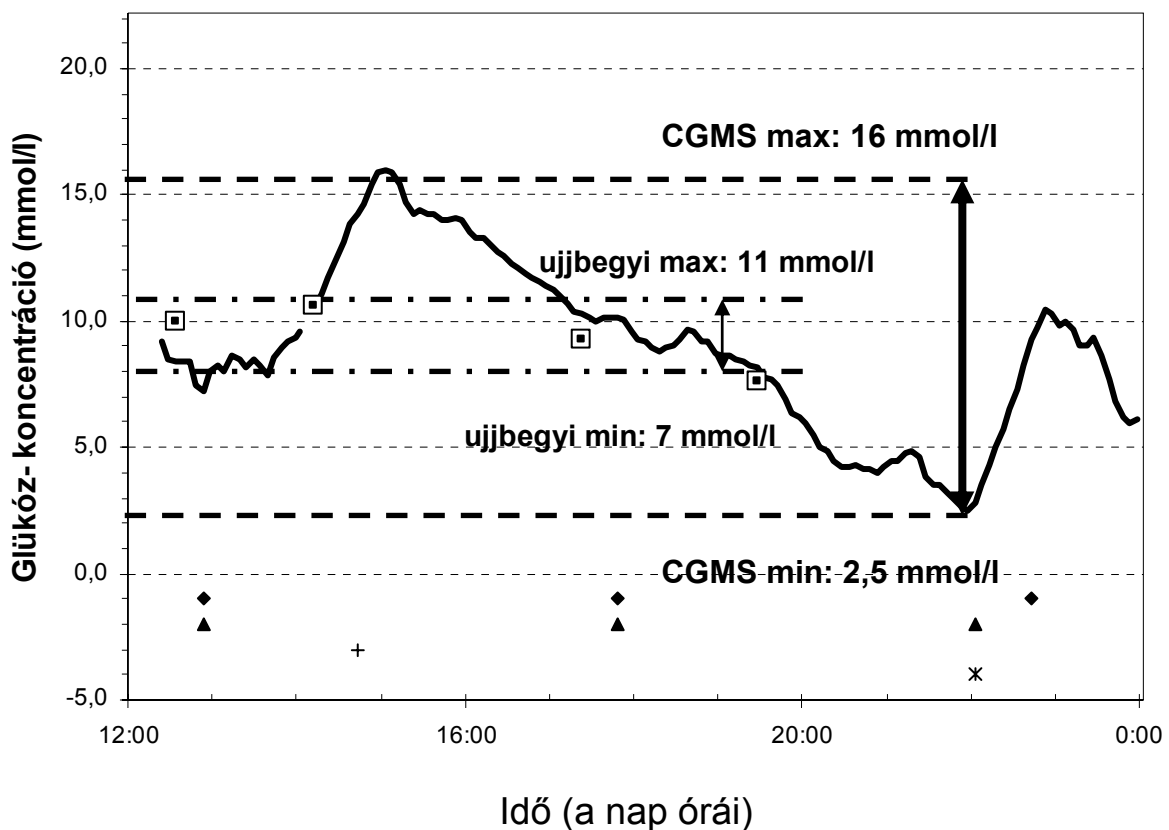
Az első mérést követően átlagosan 7,6 hónappal kontroll mérést végeztünk. A vizsgálat menete mindenben megegyezett az első méréssel. Emellett ismételt laborvizsgálatokra is sor került (HbA_{1c}, frukt).

Végül a két mérés eredményeit összehasonlítva vizsgáltuk az elvégzett terápiamódosítás szénhidrát-anyagcserét befolyásoló hatását.

A mérési eredményeink kiértékelése az SPSS 13.0 program segítségével történt. Munkánk során párosított, kétmintás t-próbát használtunk, az értékeket átlag \pm SEM alakban adtuk meg.

3.4. Eredmények

A 3. ábrán egyik 1-es típusú diabéteszes betegünk 12 órás CGMS regisztrátuma látható. Megfigyelhető, hogy míg a beteg által ujjbegyből mért úgynevezett négyponos vércukorértékek 7 és 11 mmol/l közöttiek, addig a CGMS-szenzor által mért cukorértékek jóval szélesebb tartományban, 2,5 és 16 mmol/l között ingadoztak.



3. ábra: 1-es típusú cukorbeteg 12 óra időtartamú CGMS regisztrátuma

(Folyamatos fekete vonal: CGMS által mért **intersticiális** cukorértékek, \square : a beteg által mért ujjbegyi vércukorértékek, \blacklozenge : inzulinadás, \blacktriangle : étkezés, +: testmozgás, *: hipoglikémia érzet, vékony fekete nyíl: az ujjbegyből mért vércukorértékek ingadozásának az amplitúdója, **vastag fekete nyíl:** a CGMS által mért cukorértékek ingadozásának az amplitúdója)

Az első méréskor az összes betegre vonatkoztatva a CGMS által a teljes mérési periódusban mért cukorértékek átlaga (Szenzor) $8,3 \pm 1,8$ mmol/l, a betegek által ujjbegyből mért vércukorértékek átlaga (Ujjbegy) pedig $8,7 \pm 2,1$ mmol/l volt és a kettő jól korrelált egymással ($r = 0,682$; $p < 0,001$). Az első mérés előtt a betegek átlagos HbA_{1c} szintje $8,44 \pm 1,79$ %, frukt szintje 388 ± 79 $\mu\text{mol/l}$ volt. A kétféle módszerrel mért cukorértékek és a hosszabb távú szénhidrát-anyagcsere paraméterek közötti összefüggéseket az 2. táblázatban tüntettük fel. Minden esetben pozitív korrelációt találtunk ($p < 0,05$).

2. táblázat: *Összefüggés a szénhidrát-anyagcsere paramétereinek között az első mérés alkalmával.*

	HbA_{1c}	Frukt
Szenzor	0,304	0,293
Ujjbegy	0,277	0,316

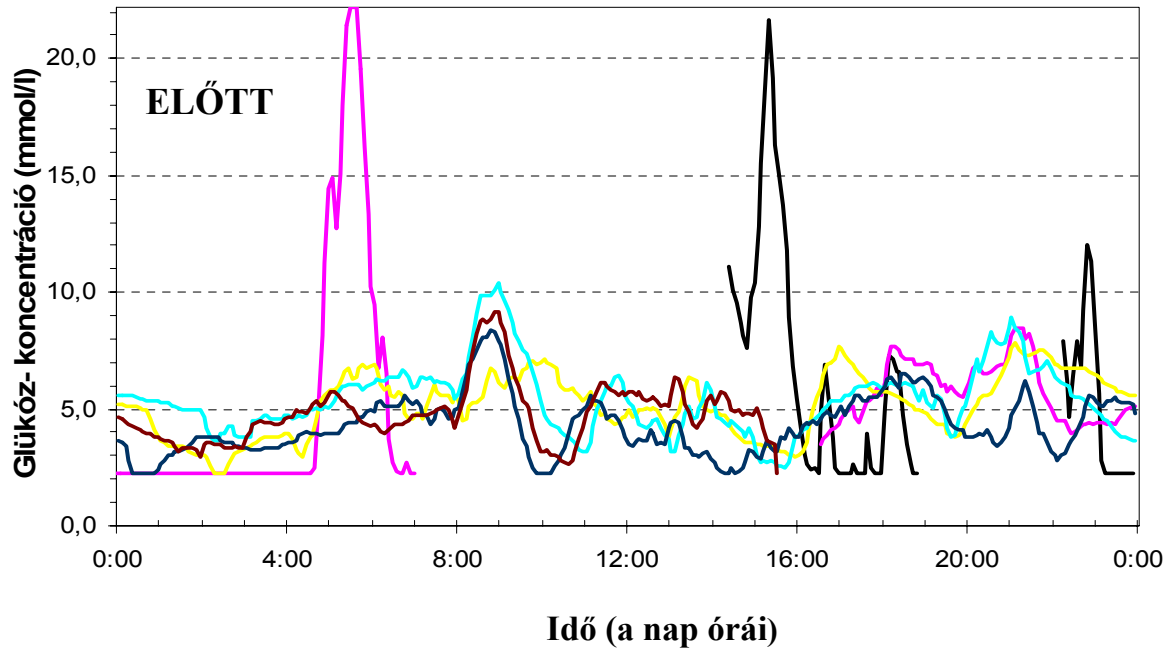
A táblázat korrelációs koefficiens (r) értékeit mutat, $n=29$. Szenzor: CGMS-sel mért intersticiális cukorértékek átlaga; Ujjbegy: glükométerrel mért ujjbegyi vércukorértékek átlaga.

Vizsgálataink során- a CGMS készülék adatfeldolgozó programjával megegyezően - hiperglikémiának a 10 mmol/l feletti, hipoglikémiának pedig a 3,9 mmol/l alatti glükózértéket tekintettük. A hiperglikémiák átlagos száma 8 eset/96óra/beteg, a hipoglikémiák átlagos száma 7 eset/96óra/beteg volt, melyből 3 eset/96óra/beteg tünetmentes hipoglikémia volt. Az összes mérés eredménye alapján az első méréskor az átlagos hiperglikémiás időindex (a teljes mérési időtartamból hiperglikémiában töltött idő) 27,85%, az átlagos hipoglikémiás időindex (a teljes mérési időtartamból hipoglikémiában töltött idő) pedig 12,11% volt.

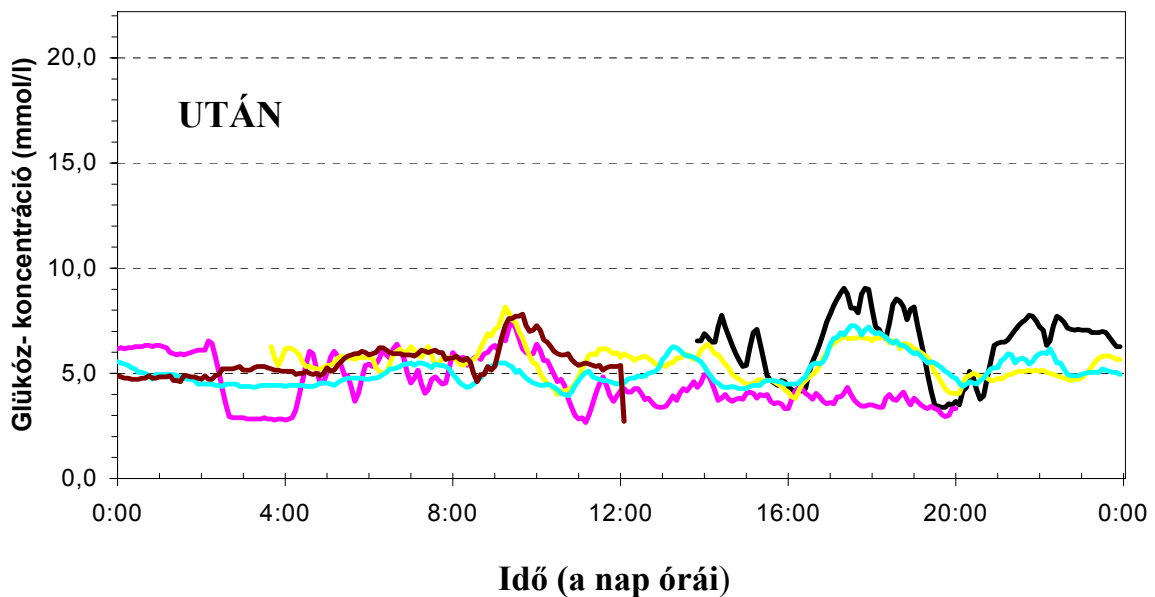
A 4/a és a 4/b ábrán a kezelés célzott módosításának hatására bekövetkező változásokat egyik 1-es típusú cukorbetegünk reprezentatív példáján szemléltetjük. Az első mérés idején a HbA_{1c} : 5,72 %, a frukt: 285 $\mu\text{mol/l}$, a testtömegindex (BMI): 19,6 kg/m^2 , a beteg inzulin-szükséglete 22 E/nap azaz 0,47 E/ttkg/nap volt (4/a ábra). A 3,5 hónap múlva elvégzett kontroll mérés alkalmával a cukorszint-ingadozások kifejezett csökkenését és a szénhidrát-anyagcsere paramétereinek mérsékelt javulását tapasztaltuk: HbA_{1c} : 5,36%, frukt: 240 $\mu\text{mol/l}$. Eközben a BMI: 20,6 kg/m^2 -re emelkedett, a beteg inzulin-szükséglete pedig 19

E/nap volt, azaz 0,39 E/ttkg/nap-ra csökkent (4/b ábra).

4/a ábra

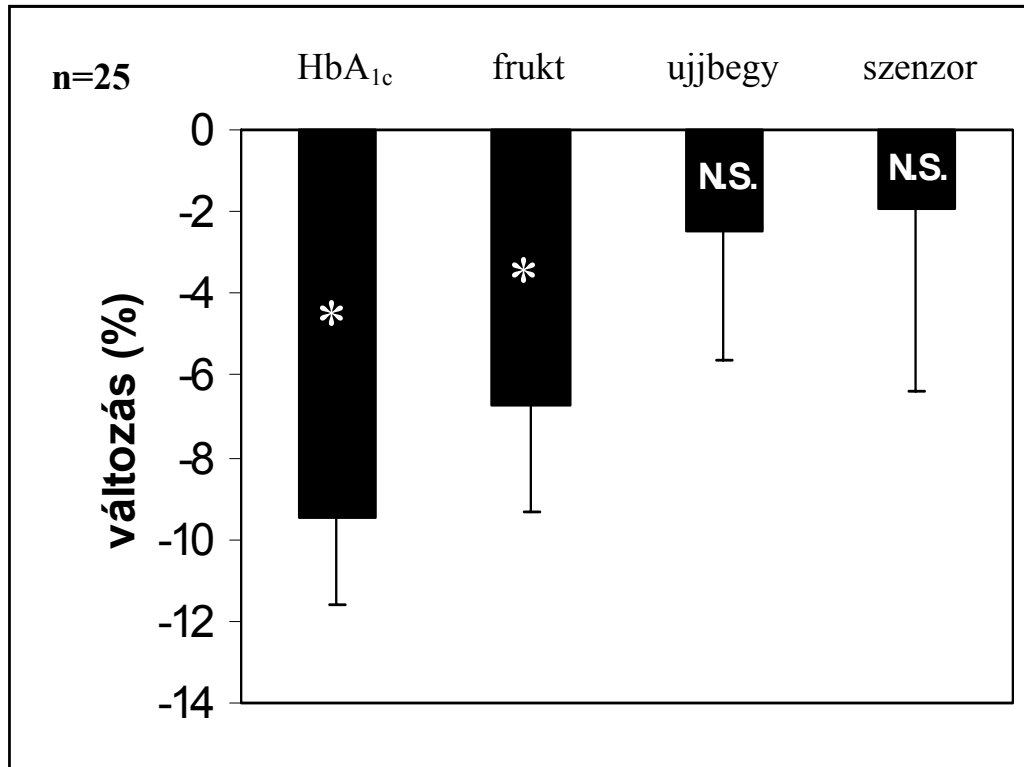


4/b ábra



4. ábra: A kezelés CGMS monitorozás alapján végzett célzott módosításának hatása (40 éves nőbetegünk CGMS regisztrátuma a kezelés módosítása előtt [4/a] és 3,5 hónappal a kezelés módosítása után [4/b]. Az ábrákon 5 napig, napi 24 órán keresztül mért eredmények láthatók. Az egyes görbék különböző napokat jelentenek)

Huszonöt betegnél a kezelés CGMS alapján végzett célzott módosítása után a HbA_{1c} 9,5%-os (p=0,001), a frukt 6,7 %-os (p=0,017), a CGMS által mért cukorértékek 1,96%-os (p=0,324) és az ujjbegyi vércukorértékek 2,5%-os (p=0,573) átlagos csökkenését észleltük a kiindulási értékhez képest (5. ábra).

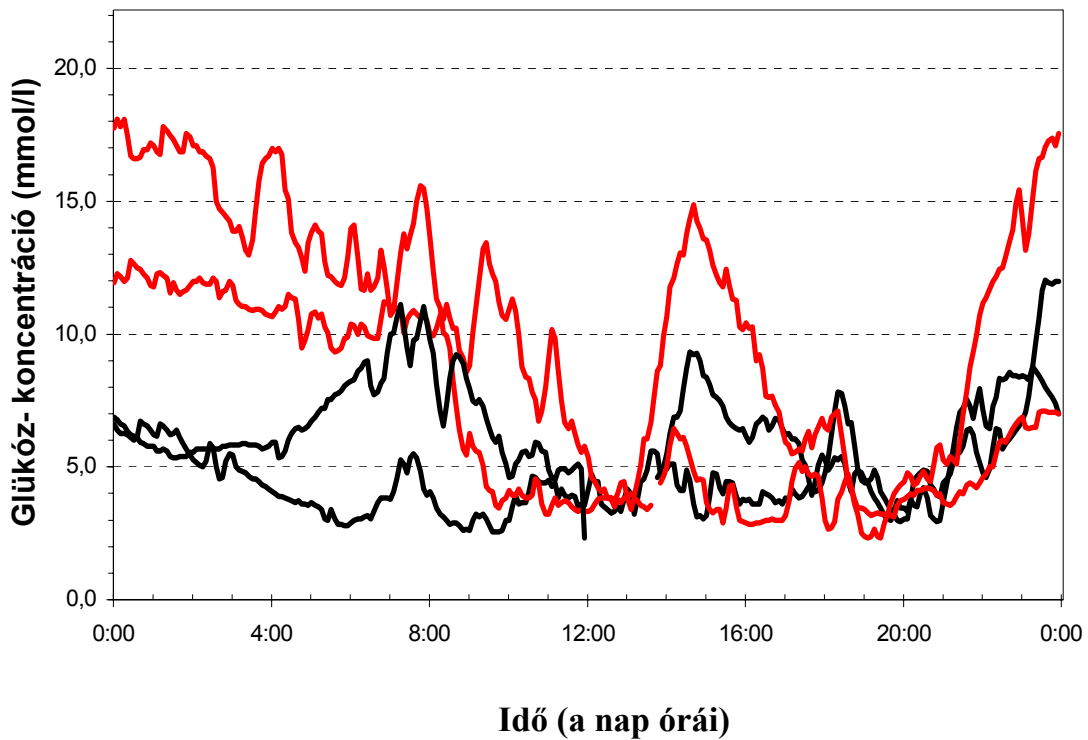


5. ábra: A szénhidrát-anyagcsere javulása a kontroll mérés alkalmával. (n=25, Ujjbegy: ujjbegyi vércukorértékek átlagának relatív változása, szenzor: CGMS által mért cukorértékek átlagának relatív változása; *: p<0,05, N.S.: nem szignifikáns, az adatok a relatív változás átlagát ± SEM értéket jelentenek a kiindulási érték százalékában kifejezve)

A betegeknel az első monitorozás eredményeit figyelembe véve a kezelést egyénre szabott módon módosítottuk. Így sor került az inzulin dózisának, illetve az inzulin injekciók beadási időpontjának megváltoztatására, az inzulinadagok átcsoportosítására, ismételt diétás tanácsadásra és szükség esetén diétás változtatásra. Négy beteg esetében glargine inzulin került bevezetésre, öt beteg esetén ultragyors hatású inzulinanalóg kezelésre váltottunk. Mindez a betegek inzulin dózisának 7,3%-os ($p=0,742$), szénhidrátbevitelük 6,6%-os ($p=0,191$) átlagos csökkenésével járt. Eközben a betegek testtömege (+0,8%; $p=0,296$) és BMI-je (+1,2%; $p=0,244$) sem változott szignifikánsan.

Négy, nem kooperáló betegünknel az anyagcsere-állapot romlását észleltük. Valamennyi betegünk képes volt megfelelően elsajátítani a készülékkel kapcsolatos gyakorlati teendőket.

A 6. ábrán egy 27 éves, 1-es típusú diabéteszes nőbetegünk CGMS regisztrátuma látható. A betegnek a vizsgálat 3. napján kezdődött a menstruációja. Az ábrán látható a menstruáció szénhidrát-anyagcserére gyakorolt kifejezett hatása.



6. ábra: A menstruáció hatása követhető CGMS monitorozással

(27 éves nőbeteg, 16 éve ismert 1-es típusú cukorbetegsége. HbA_{1c} : 7,5%, frukt: 296 $\mu\text{mol/l}$, BMI: 26,9 kg/m^2 . Az ábrán 4 nap mérési eredményei láthatók. fekete vonal - menstruáció előtti napok, **piros vonal** - menstruáció alatti napok)

3.5 Megbeszélés

A Minimed Medtronic által gyártott CGMS készülék 1999-ben került forgalomba és azóta számos vizsgálat igazolta a hagyományos vércukormérő eljárásokhoz viszonyított előnyeit. A CGMS vizsgálat legfőbb indikációját a rendezetlen szénhidrát-anyagcsere jelenti. Fontos indikációs terület a gyakori hipoglikémiák és különösen a tünetmentes hipoglikémiák gyanúja (21,22,23,24,25). A CGMS monitorozás emellett igen hasznos lehet korai terhességben, illetve inzulinpumpás betegeknek a glikémiás státusz szoros kontrollálására (21). A gyermek diabetológiában is igazoltan számtalan előnnyel bír. Segítségével az 1-es típusú diabéteszes gyermekeknek is sokkal könnyebben kialakítható az egyénre szabott inzulinterápia, javítható az anyagcserestátusz (22,23,24). Betegedukációs, motivációt növelő hatása nem elhanyagolható egyetlen korosztálynál sem. A CGMS monitorozást elsősorban 1-es típusú cukorbetegségnek végezzük.

A posztprandiális hiperglikémia, az étkezést követő gyors vércukorszint-emelkedés etiológiai szerepe mind a mikro-, mind a makrovaszkuláris szövődmények tekintetében jól ismert. 2-es típusú, nem inzulinkezelt cukorbetegségnek CGMS-sel végzett klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a glikémiás paraméterek alapján elfogadható anyagcsere-állapot esetén is igen jelentős az egy napra vonatkoztatott hiperglikémiás időtartam, a jelentősebb posztprandiális vércukorszint-emelkedések (25). Mindezek alapján kimondható, hogy 2-es típusú, orális antidiabetikummal kezelt, látszólag kielégítő szénhidrát-anyagcseréjű cukorbetegségnek a posztprandiális hiperglikémiák és a glikémiás instabilitás kimutatására a HbA1c-mérés önmagában alkalmatlan és a CGMS monitorozás náluk is igen nagy gyakorlati jelentőséggel bír. A mérési eredmények alapján 2-es típusú cukorbetegségnek is olyan terápiás módosítások végezhetők, melyek a glikémiás instabilitás csökkentése által hozzájárulnak a késői szív-érrendszeri szövődmények megelőzéséhez (25).

A folyamatos cukormonitorozás indikációit a 3. táblázatban foglaltuk össze:

3. táblázat: A folyamatos cukormonitorozás indikációi

BETEGEK	INDIKÁCIÓK
1-es típusú diabétesz	<ol style="list-style-type: none">1. rossz glikémiás kontroll, a HbA_{1c} emelkedése2. rekuráló hipoglikémiák, súlyos hipoglikémiákra való hajlam3. tünetmentes hipoglikémia gyanúja4. új terápiás stratégia bevezetése előtt és után (analóg inzulin, inzulinpumpa)5. terhességben (jelentős vércukorszint ingadozások)6. gyermekkorban (Somogyi effektus kivédése)7. betegedukáció, motiváció növelése minden életkorban (nem önálló indikáció)
2-es típusú diabétesz	<ol style="list-style-type: none">1. inzulin terápia bevezetése2. rossz anyagcserestátusz3. megfelelő anyagcserestátusz esetén?
Egyéb	ismeretlen eredetű hipoglikémia, inzulinoma gyanúja

A glükóz a kapilláris endotélből a koncentráció-grádiensnek megfelelően egyszerű diffúzióval kerül az intersticiális térbe (26,27). Az intersticiális folyadék glükóztartalma a plazmából történő diffúzió és a bőr alatti kötőszöveti sejtek glükóz felvételének függvénye (27). Fontos kiemelni, hogy a CGMS készülék nem vércukrot, hanem az intersticiális folyadék glükóz-koncentrációját méri. Ez irodalmi adatok szerint nagyon jó korrelációt ($r \approx 0,8$) mutat a vércukorértékekkel (17,18,27,28) és időben körülbelül 4-10 perccel követi a vércukorszint változásait (26,27,28). Ez az időbeni eltolódás („lag time”) lassú vércukorszint-változásoknál a két folyadéktér közötti diffúziós idő függvénye, míg gyors vércukorszint-változás esetén inkább a koncentráció-változás nagysága határozza meg a „lag time” időtartamát (27). Más közlemények szerint a „lag time” jelentős részben a szenzorok működésére jellemző sajátosság és nem csak a vércukorszint és az intersticiális cukorszint közötti kiegyenlítődéshez szükséges időtartam. A CGMS készülék számítógépes programja az intersticiális glükózsint mérésénél a késedelmi időt automatikusan figyelembe veszi.

Ezzel szemben a vércukorszint csökkenését általában megelőzi az intersticiális cukorszint csökkenése, mely a vércukorszint normalizálását követően is egy ideig annál alacsonyabb marad. Ennek magyarázata az intersticiális folyadékból párhuzamosan a sejtekbe irányuló cukorbevétel (27). A központi idegrendszerben észlelhető, a plazmánál kisebb vércukorszint-ingadozások jobban korrelálnak az intersticiális cukorszintekkel (27).

Vizsgálatainkban mi is hasonlóan jó korrelációt találtunk a kétféle mérés eredményei között. Emellett a CGMS által mért eredmények és a hosszabb távú szénhidrát-anyagcsere paraméterek (HbA_{1c} , frukt) között is pozitív korreláció állt fenn (2. táblázat). A kezdeti magas átlagos HbA_{1c} szint magyarázata az, hogy vizsgálatunk során azokat a betegeket monitoroztuk, akiknél rossz anyagcsereállapot miatt a kezelés módosítását terveztük.

A HbA_{1c} és a frukt – mint a szénhidrát-anyagcsere hosszútávú markerei – az átlagos vércukorértékeknek megfelelően változnak, azonban egyáltalán nem jelzik a cukorszint-ingadozásokat. Így előfordulhat, hogy a beteg látszólag, a laboreredmények alapján kielégítő glikémiás állapotban van, valójában azonban vércukorértékei nagyon is ingadozóak, ami – mind a hiperglikémiás, mind a hipoglikémiás epizódusok miatt – hosszú távon súlyos szövödmények kialakulásához vezethet. Az ingadozásokat ezen glikációs paramétereknél jobban jelzi a megfelelő otthoni ujjbegyi vércukor-önellenőrzés, azonban a hipo- és hiperglikémiák egy része így is rejtve maradhat. A CGMS készülék egyik nagy előnye, hogy gyakorlatilag folyamatos, egész napi vércukorprofilt ábrázol. Segítségével tájékozódhatunk a rendszeres ujjbegyi vércukormérésekkel is rejtve maradó vércukorszint-ingadozásokról, valamint segíthet az éjszakai vércukorszint-ingadozások, a Somogyi-effektus és a hajnali-

jelenség elkülönítésében is (29,30). Saját vizsgálatunkban a CGMS általi mérések az ujjbegyi vércukorértékeknel jóval nagyobb cukorszint-ingadozásokat igazoltak (3. ábra).

Nagy számban jelentek meg közlemények a CGMS tünetmentes hipoglikémiákat igazoló eredményeiről (29,30). Kimutatták, hogy még szigorúan ellenőrzött cukorbetegéknél is sokkal gyakoribbak a rejtett, aszimptómás hipoglikémiák, mint azt korábban gondoltuk. Sőt, minél inkább célértékek beállítására törekszünk, annál nagyobb az esély a hipoglikémiák kialakulására. A legveszélyesebbek pedig a betegek által nem észlelt, tünetmentesen lezajló hipoglikémiák, melyek hatása hosszú távon mindenben megegyezik a beteg által észlelt hipoglikémiákkal. Diabéteszes betegeknek a vegetatív neuropátia is befolyásolja a hipoglikémia vegetatív tüneteinek érzékelését, súlyos vegetatív neuropátiás betegek hipoglikémia-érzékelése jelentősen károsodott. Jól ismert a hipoglikémiáknak a diabétesz kardiovaszkuláris szövődésének kialakulásában, valamint a mentális funkciók hanyatlásában betöltött szerepe. A legtöbb diabéteszes betegnél szimptómás és aszimptómás hipoglikémiák egyaránt előfordulnak (29,30).

Vizsgálatunk során mi is azt tapasztaltuk, hogy az első mérés alkalmával a 4 nap alatt igen jelentős volt a tünetmentes hipoglikémiák átlagos száma (8 hipoglikémiából 3 aszimptómás volt). A legtöbb betegnél szimptómás és aszimptómás hipoglikémiák egyaránt előfordultak.

A CGMS készülék alkalmazásával a hipoglikémiás epizódok gyakoriságának növelése nélkül jobb glikémiás kontroll érhető el diabéteszes betegeknek (24,31) A vizsgálat további nagy előnye a négyponos ujjbegyi vércukormérésekhez képest, hogy a több napos mérési eredmények alapján számos esetben látványos tendenciák vehetők észre a vércukorszint ingadozásában. Ezen tendenciák alapján a kezelés egyénre szabott módosításai hajthatók végre. Betegeinknél is sor került az inzulin terápia és a diéta módosítására. Mindezen változtatások végeredményben a szénhidrát-anyagcsere javulását eredményezték.

Átlagosan 7,6 hónappal a kezelés első monitorozás alapján végzett célzott módosítása után a legtöbb esetben a vércukorértékek és a hosszú távú szénhidrát-anyagcsere utaló paraméterek javulását észleltük (4. ábra). Mindezt úgy értük el, hogy a betegek inzulin dózisát és szénhidrát-bevitelét még kis mértékben csökkenteni is tudtuk, és testtömegük sem változott szignifikánsan.

A kontroll méréseket ideális esetben 3 hónappal az első mérést követően célszerű elvégezni. Vizsgálatunk során a kontroll mérésekre átlagosan 7,6 hónappal az első mérést követően került sor. Ennek oka az volt, hogy a betegek jelentős része az ismételt monitorozást csak akkor vállalta, mikor ismét cukoranyagcsere-problémái jelentkeztek.

Vannak olyan esetek is, amikor a CGMS készülék használata sem tud segíteni. Vizsgálatunkban 4 betegnél a második mérés alkalmával nem tapasztaltunk szénhidrát-anyagcsere javulást. Ők valamennyien fiatal (20-30 év), 1-es típusú cukorbeteg volt, akik a megfelelő edukáció ellenére már gyermekkoruk óta köztudottan igen rossz compliance-szel rendelkeztek. Náluk a kontroll mérésekre újabb anyagcsere-kisiklás kapcsán, igen rossz anyagcsere-állapotban, a tervezettől jelentősen eltérő időpontban került sor. Megfelelő együttműködés hiányában a CGMS monitorozással sem vagyunk képesek csodát tenni.

Az adatok letöltésére és kiértékelésére szolgáló mindkét program alkalmas a teljes mérési időtartam eredményeinek összesített, valamint napokra lebontott numerikus és grafikus megjelenítésére, emellett összegző statisztikát is szolgáltatnak (21). Az új program (MiniMed Solutions CGMS 3.0) az eredmények szélesebb körű értékelését adja (hipoglikémiás-, hiperglikémiás indexek, hipoglikémiák és hiperglikémiák száma, glucose area above high limit - hyper AUC azaz „hiperglikémiás impakt”, glucose area under low limit - hypo AUC azaz „hipoglikémiás impakt”), és alkalmas az étkezésekhez viszonyított cukorszint-ingadozások kimutatására is. A régi program (MiniMed CGMS Graphs V1.7A) előnye, hogy az adatokat és a grafikonokat statisztikai értékelésre alkalmas Excel formátumban szolgáltatja. Gyakorlatunk alapján ezért a mérési eredmények értékeléséhez a két program együttes használatát javasoljuk.

Vizsgálataink során számtalan előnyös tulajdonsága mellett néhány hiányosság is felmerült a CGMS készülékkel kapcsolatban. A készülék egyik legfőbb hátránya, hogy nem jelzi folyamatosan a mért cukorértékeket, azaz nem real-time üzemmódban működik. A betegek véleménye szerint ez a visszajelzés hasznos lenne és talán a motivációjukat is tudná növelni.

Hátrálynak tekinthető a folyamatos külső kalibráció szükségessége. Ezáltal a CGMS készülék a vércukor önellenőrzést nem helyettesítheti, csak annak kiegészítő módszerként alkalmazható. A szenzor implantációját követően a mérés megkezdése előtt egy hosszabb, 1 órás kezdeti kalibrációs idő szükséges. A beszúrást követően a szenzor szöveti sérülést okoz az intersticiális térben, ezáltal gyulladáshoz vezet, a gyulladáshoz pedig elhasználják a jelen lévő glükóz egy részét (27,28). Emellett idő szükséges az intersticiális folyadék szenzorba való teljes diffúziójához. Ez idő alatt a szignál erőssége, tehát a glükóz-koncentráció folyamatosan változik, mielőtt stabilizálna (27). Ez a folyamat a későbbi pontos méréshez nélkülözhetetlen.

Az újjbegyi vércukorértékekkel történő folyamatos külső kalibrációt a szenzorok folyamatos érzékenység-csökkenése miatt szükséges elvégezni. Ez az érzékenység-csökkenés

biokompatibilitási problémák, a szenzor felületén végbemenő nem specifikus fehérje precipitáció és az elektród vezetőképesség-csökkenésének következménye lehet (27). Emellett a szenzor felszínét kötőszöveti sejtek boríthatják be, valamint fehérjebontó enzimek és szabadgyökök is károsíthatják (27).

A napi négynél több kalibrációs vércukorérték bevitele nem javítja jelenősen a mérés pontosságát. A kalibráció szempontjából lényegtelen, hogy étkezés előtti vagy utáni vércukorértékeket viszünk be a készülékbe. Viszont a mérés pontosságát javítja az éjszakai vércukorérték bevitele, továbbá az, ha a kalibrációs értéket stabilabb vércukorszintnél és nem gyors vércukorszint-ingadozás idején visszük be a készülékbe (32).

Nehézségként felmerülhet, hogy a betegek által mért ujjbegyi vércukorértékeket mg/dl mértékegységben kell a készülékbe bevinni. Ez azonban egy egyszerű átszámolással ($\times 18$), illetve mg/dl mértékegységű glükométerekkel kiküszöbölhető.

Az új software által nyújtott hyper-AUC és hypo-AUC értékek a gyakorlatban a magas és alacsony rizikójú betegek elkülönítésére nem használhatók. A program az AUC értékeket ugyanis mmol/l*nap mértékegységben adja meg, ami nem jelzi az egyes betegek közötti különbségeket. Praktikus lenne az AUC értéket mmol/l*h-ban kiszámítani. Hasznos lenne továbbá egy, a cukorszint-ingadozásokat jobban jelző paraméter szoftveres meghatározása is, hiszen az átlag \pm SD megadása nem jelzi elég érzékenyen a glükózsztint-ingadozásokat.

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a CGMS a hagyományos négy pontos ujjbegyi vércukormérésnél lényegesen pontosabban jelzi a vércukorszint ingadozásait és kifejezetten alkalmas a tünetmentes hipoglikémiák kimutatására is. A módszer egyértelműen nagy segítséget jelent a személyre szabott, individuális inzulinkezelés kialakításában és a betegek anyagcsere-állapotának javításában. Így a CGMS mérés alapján elvégzett terápia-módosítás hozzájárulhat a késői diabéteszes szövődmények gyakoriságának csökkentéséhez. A módszer azonban nem a hagyományos otthoni ujjbegyi vércukormérések helyettesítésére, hanem annak kiegészítésére hivatott. A készüléket könnyű kezelhetősége és kiváló tolerálhatósága alkalmassá teszi a minél szélesebb körben való elterjedésre.

Napjainkra az CGMS készülék számos továbbfejlesztett változata került forgalomba, melyek a kezdeti készülék előnyeinek megtartása mellett további előnyös tulajdonságokkal bírnak. A MiniMed 2004-ben mutatta be Guardian elnevezésű készülékét, mely a betegek számára veszélyt jelentő magas és alacsony vércukorértékekre hangjelzéssel figyelmeztet. Egy évvel később a Guardian RT (real time) készülék már real-time üzemmódban 5 percenként a beteg által is folyamatosan követhető mérési eredményeket szolgáltatott. 2006-ban pedig a MiniMed Paradigm REAL-Time a CGMS készülék és az inzulinpumpa egy

készülékbe történő egyesítésével további távlatokat nyitott inzulin pumpával kezelt betegeknek. Emellett megjelentek hosszabb élettidejű glükóz-szenzorral működő készülékek (SEVEN és SEVEN PLUS, DexCom Inc, San Diego, CA), melyek előnye, hogy a 7-10 napig kivitelezhető mérések mellett a mérési eredmények összetettebb grafikus megjelenítését szolgáltatják, a cukorszint-ingadozások pontosabb nyomonkövetését és elemzését teszik lehetővé.

A Medtronic által kifejlesztett iPro CGM készülék a folyamatos glükózmonitorok legújabb generációjához tartozik. A készülék hagyományos glükóz-szenzorból és egy hozzá csatlakoztatható kisméretű adatátvivő egységből áll. A készülékhez a korábbiakhoz hasonló monitor nem tartozik, az adatátvivő egységet a szenzorról 3 nap után leválasztva az adatokat egy számítógéphez csatlakoztatható egység olvassa le és konvertálja vércukorértékekké. A készülék tehát nem real time üzemmódban működik és a működéséhez továbbra is legalább napi négyszeri ujjbegyi kalibrációs vércukorérték bevitelét igényli.

A készülékek biológiai alkalmazhatóságának kiértékelésével számos összefoglaló közlemény foglalkozott. A mérési eredmények, különösen a klinikai szempontból kiemelt jelentőségű cukorszint-ingadozások egységes statisztikai kiértékelésére elfogadott standard módszerek azonban még napjainkban sem állnak rendelkezésre.

A folyamatos cukormonitorozás egyre inkább megváltoztatja a diabéteszes betegek életét. A hihetetlenül gyors technológiai fejlődés ellenére a készülékek működéséhez továbbra is ujjbegyi kalibrációs vércukorértékek rendszeres bevitele szükséges, így alkalmazásuk napjainkban is csak kiegészítő diagnosztikus lehetőségként jön szóba. Reményeink szerint a közeljövőben további fejlesztéseket követően önálló módszerként, egyre szélesebb körben elterjedve hozzá fognak járulni a diabéteszes betegeknek a jobb glikémiás kontroll eléréséhez.

4. AZ OXIDATÍV STRESSZ MONITOROZÁSÁNAK LEHETSÉGES ÚJ MÓDSZERE: A HIDROGÉN-PEROXID (H₂O₂) AMPEROMETRIÁS ELVEN VALÓ MÉRÉSE INAKTIVÁLT GLÜKÓZ-SZENZOR SEGÍTSÉGÉVEL (I,VII)

4.1. Bevezetés

4.1.1 A reaktív oxigén származékok (ROS)

A reaktív oxigén származékok (ROS) – mióta fény derült rá, hogy a szervezet számos fiziológiás és patológias folyamatában fontos szerepet játszanak – a kutatók érdeklődésének középpontjában állnak.

A ROS gyűjtőfogalom, melybe szabadgyök természetű oxigén származékok - úgymint a szuperoxid-anion (O₂^{•-}), hidroxil-gyök (•OH), peroxil-gyökök (ROO[•]), alkoxil-gyök - valamint nem szabadgyök természetű oxigén származékok - például a hidrogén-peroxid (H₂O₂) – tartoznak (33).

A szabadgyök olyan molekula, amelynek külső molekulaorbitálján párosítatlan spinű elektron van jelen. A párosítatlan elektron révén rendkívül reakcióképesek, így féléletidejük nagyon rövid. A nem gyök természetű reaktív oxigén származékok is igen reakcióképesek, féléletidejük a szabadgyökökénél alig hosszabb.

A ROS-ok fő intracelluláris forrásai a mitokondriumok, melyek teljes oxigén felhasználásának összesen 1-2%-ból képződik ROS. A mitokondriumokban legalább tíz potenciális forrását mutatták ki a ROS termelésnek. Közülük a legjelentősebbek a légzési lánc – a Krebs-ciklus – enzimkomplexei, melyek közül az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz és a piruvát-dehidrogenáz a O₂^{•-} és a H₂O₂ szignifikáns mitokondriális forrásai (33).

A mitokondriumok azonban a ROS képzés mellett egyben az oxidatív stressz fő céltáblái is, a mitokondriális DNS károsodások - ezidáig ismeretlen mechanizmussal - a sejtek apoptózisában is szerepet játszanak (33).

A citoszol H₂O₂ termelésében fiziológiás körülmények között a peroxiszómák játszanak szerepet. Emellett az endoplazmatikus retikulum monooxygenázai (pl. a citokróm P450 enzim) is részt vesznek a H₂O₂ és a O₂^{•-} képzésében (33).

A mitokondriumokban az ATP fő forrását jelentő elektron-transzport lánc működése során kisszámú elektron idő előtt reakcióba lép az oxigénnel és ezáltal O₂^{•-} keletkezik. A O₂^{•-} aniont primer ROS-nak tekinthetjük, amely legnagyobb mennyiségben a mitokondriumokban keletkezik. A O₂^{•-} számos betegség patofiziológiájában kiemelt szerepet játszik. A O₂^{•-} -ből

különböféle enzim-, vagy fém-katalizálta reakciók során úgynevezett szekunder ROS-ok képződnek (34).

A sejtek redox homeosztázisának szigorú szabályozásában a vas igen fontos szerepet játszik. In vivo fiziológias körülmények között az intracellularis vas vaskötő fehérjékben szekvesztrálódik, így a hozzáférhető, szabad Fe^{2+} ionok mennyisége elhanyagolható (34). Oxidatív stressz esetén azonban a sejtekben nagy mennyiségben képződő $\text{O}_2^{\bullet-}$ szabad vas-ionokat (Fe^{2+}) mobilizál a vasraktárakból:

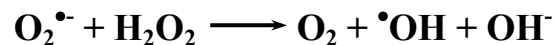


amely ezután a Fenton reakcióban $\bullet\text{OH}$ képzését katalizálja (34):



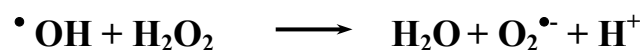
A $\bullet\text{OH}$ egy igen veszélyes, nagy reakciókészséggel rendelkező és ezáltal igen rövid féléletidejű ROS.

A fenti két reakció eredőjeként a $\text{O}_2^{\bullet-}$ a Haber-Weiss reakció során H_2O_2 -vel reakcióba lépve ugyancsak $\bullet\text{OH}$ képzését segíti elő (34):



A fenti lánreakciót 1933 körül írta le Haber és Weiss.

A szabad gyökök egymással is reakcióba lépnek, például a $\bullet\text{OH}$ és H_2O_2 reakciója során $\text{O}_2^{\bullet-}$ jön létre.



A ROS-ok valamennyi intracellularis makromolekula szerkezetét és fiziológias működését károsítják. A foszfolipidek peroxidációja révén megváltoztatják a sejtmembránok szerkezetét és permeabilitását, emellett a proteinek tiol-csoportjainak oxidációját és DNS károsodást okozva számos betegség patogenezisében és az öregedés patofiziológiájában is

központi szerepet játszanak. A diabétesz mellitusz és a kardiovaszkuláris kórképek – atheroszklerózis, iszkémiás szívbetegség, hipertónia, kardiomiopátiák, szívizom hipertrófia és a kongesztív szívelégtelenség - mellett számos tumoros betegség, a Parkinson kór, az Alzheimer kór és a reumatoid artritisz patogenezisében is bizonyítottan kiemelt szerepet kap a fokozott ROS termelés és ezáltal a redox homeosztázis egyensúlyának felbomlása (34).

Az oxidatív stressz elleni védelemért az antioxidánsok felelősek. Az enzimatisz antioxidánsokhoz tartozik a SOD, a kataláz és a glutation-peroxidáz enzim. A nem-enzimatisz antioxidánsok csoportjába pedig az aszkorbinsav (C-vitamin), az alfa-tokoferol (E vitamin), a redukált glutation (GSH), valamint a karotinoidok, flavonoidok tartoznak. Fiziológias körülmények között a prooxidánsok és antioxidánsok egyensúlya biztosítja a sejtek túlélését.

A ROS természetű molekulák sejtkárosító hatásuk mellett bizonyítottan a sejtek jelátviteli, szignál transzdukciós folyamataiban is igen fontos szerepet játszanak. A sejtmembránhoz kötött NADPH-oxidáz által termelt reaktív oxigén származékoknak a jelátviteli folyamatokban igen fontos szerepük van. A legtöbb sejtípus citokinek, növekedési faktorok és hormonok általi stimulációra alacsony koncentrációjú ROS képzéssel válaszol.

Az apoptózis extrinszik jelátviteli útjában is feltételezik a NADPH-oxidáz által termelt ROS természetű anyagok jelátvivő szerepét. Ezen ROS mediálta apoptotikus szignál kutatások tárgyát képezi. Ugyanakkor a ROS-ok a hagyományos, ismert receptor-ligand mediálta apoptosisban is szerepet játszanak (33).

A fagociták által termelt ROS-oknak a szervezet anti-inflammatorikus reakcióiban betöltött szerepe sem elhanyagolható (35).

4.1.2 A diabétesz mellitusz és a reaktív oxigén származékok

Diabétesz mellituszban a hiperglikémia kiváltotta szövödmények létrejöttében a fokozott oxidatív stressz központi szerepe feltételezhető. A diabéteszes mikro-, és makrovaszkuláris szövödmények kialakulásának alapját az endotél-diszfunkció képezi (36,37). Az endotél-diszfunkció lényege az endotélfüggő vazodilatáció károsodása mellett a trombocita aggregáció, leukocita adhézio és a vaszkuláris simaizomsejt proliferáció fokozott aktivitása. A háttérben a hiperglikémia indukálta fokozott oxidatív stressz és az endoteliális NO termelés szekunder csökkenése áll. Az oxidatív stressz aktiválása – így a kardiovaszkuláris szövödmények kialakulása – szempontjából a glükózsint ingadozásai jelentősebb szerepet töltenek be, mint a tartós krónikus hiperglikémia (38). A hiperglikémia indukálta kardiovaszkuláris szövödmények kialakulásában legfontosabb szerepet játszó négy útvonal: a polyol-út és a hexózamin-sönt

aktiválása, az előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end products, AGE) fokozott termelése, valamint a PKC és nuclear factor κ B (NF κ B) aktiválása (38). Brownlee kutatásai szerint mindezen folyamatok hátterében a fokozott mitokondriális $O_2^{\bullet-}$ termelés áll (39).

Diabétesz fennállása esetén a ROS-ok keletkezésének hiperglikémia indukálta legfőbb forrása a mitokondriális elektron transzport lánc (36). Míg normál körülmények között a mitokondriális elektron transzport lánc I. és III. komplexe játszik szerepet a $O_2^{\bullet-}$ képzésében, addig diabéteszben a II. komplexből származó elektron kiáramlás tehető felelőssé az oxigénből való $O_2^{\bullet-}$ képzésért (36).

Szekunder módon az AGE (advanced glycation endproducts) termékek képzése során ugyancsak keletkeznek ROS természetű anyagok (36).

Az endotélsejtekben a $O_2^{\bullet-}$ fő forrásai NADPH-oxidáz enzimek, melyek expresszióját és aktivitását a hiperglikémia szekunder módon, a protein-kináz C β (PKC β) jelátviteli útvonalon keresztül aktiválja (36,37). Emellett az AGE termékek, az inzulin és az angiotenzin is fokozni képes a NADPH-oxidáz aktivitását, ezáltal a szabadgyök képzést. Egyes kutatások szerint az érrendszerben és a vesében a glükóz indukálta ROS-képzés fő forrásai a NADPH-oxidáz enzimek, ami a NADPH-nak a diabétesz szövödményeinek kialakulásában betöltött mediátor szerepét igazolja.

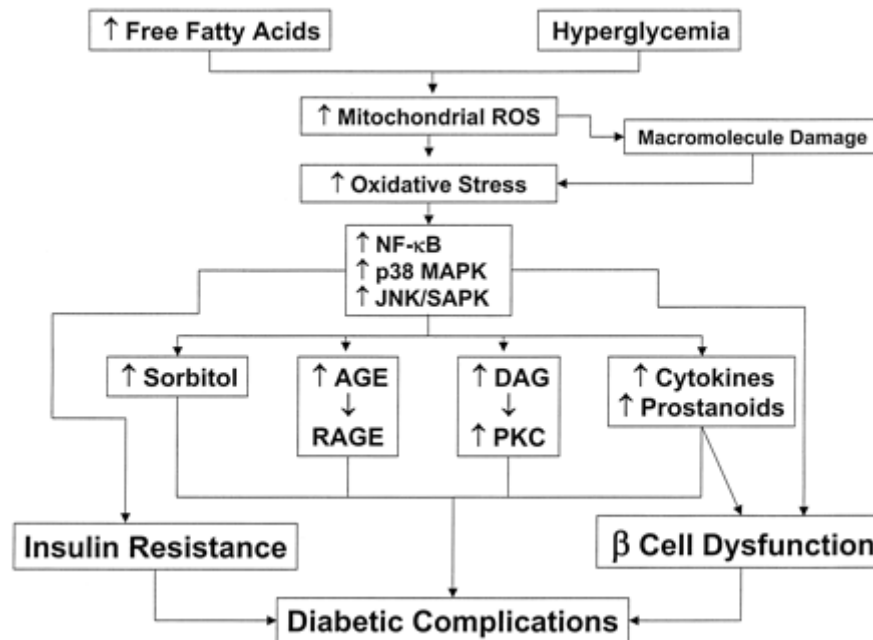
A fokozott $O_2^{\bullet-}$ termelés a dimer eNOS enzim monomer formává való szétkapcsolását is aktiválja, mely diszfunkcionális forma önmagában is fokozott $O_2^{\bullet-}$ termelést eredményez. A $O_2^{\bullet-}$ pedig az NO-val reagálva az igen reakcióképes peroxinitrit képzésében vesz részt, ezzel jelentősen hozzájárulva az NO biológiai hozzáférhetőségének – ezáltal az endotélfüggő vazodilatációnak – a csökkenéséhez (36,37).

Ismert tény, hogy a krónikus hiperglikémia a ROS képződés növelésén keresztül az inzulin bioszintézis és szekréció inhibitora, amit glükóz toxicitásnak nevezünk. A folyamat során az inzulin gén expressziója és az inzulinszekréció csökken, mely végül a béta sejtek apoptózisához vezet. A béta sejtek oxidatív stressz iránti fokozott érzékenysége csökkent antioxidáns enzimtartalmuk következménye (alacsony kataláz és glutation peroxidáz szint) (34,36). Állatkísérletek bizonyították, hogy az antioxidáns kezelés visszaállítja a fiziológiás glükóz indukálta inzulin szekréciót, szignifikánsan növeli a béta-sejt tömeget és javítja a glükóz toleranciát diabéteszes egerekben, tehát védi a béta-sejteket a glükóz toxicitástól. Az angiotenzin receptor blokkolók a béta-sejtek NADPH-oxidáz expresszióját és ROS termelését csökkentik és

ezen antioxidáns-, egyben béta-sejt védő hatásuk révén növelik a béta-sejt tömeget és az inzulin gén expresszióját (36).

A szabad zsírsavak okozta lipotoxicitás is a ROS képzés fokozásán keresztül vezet a béta-sejtek diszfunkciójához.

A ROS-ok a béta-sejt diszfunkció mellett a perifériás inzulin rezisztencia kialakulásában is szerepet játszanak, így az antioxidáns terápia a hiperglikémia indukálta inzulin rezisztencia kialakulását is képes megelőzni. Kimutatták, hogy a H₂O₂ már mikromólos koncentrációban is gátolni képes az inzulin-jelátvitelt és ezáltal inzulin rezisztenciát indukál (40). Az inzulin rezisztencia és a béta-sejt diszfunkció kialakulásában egyaránt a c-jun-N-terminal-kináz (JNK), valamint a p38 mitogén aktivált protein kináz (p38 MAPK) jelátviteli útvonalának és a nuclear factor κB transzkripció faktor (NF-κB) hyperglikémia, szabad zsírsavak, ROS-ok és gyulladásos citokinek általi aktiválásának szerepét feltételezik (41,42). Mindhárom stressz szignálként működő jelátviteli útvonal aktivációja a transzkripció folyamatok, különféle intracelluláris jelátviteli mechanizmusok megváltozásán és az apoptózis stimulációján keresztül szerepet játszik a diabétesz mellitusz és szövődményeinek kialakulásában. Ezen jelátviteli útvonalak befolyásolása a későbbiekben a diabétesz kezelésének terápiai célpontjává válhat (41,42).



7. ábra: Jelátviteli útvonalak szerepe oxidatív stressz indukálta perifériás inzulin rezisztencia és β-sejt diszfunkció kialakulásában. (Evans JL, Goldfine ID et al, Endocrine Reviews 2002.)

4.1.3 A hidrogén-peroxid (H₂O₂)

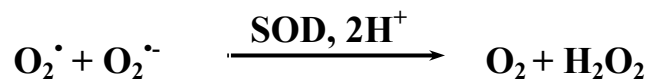
A H₂O₂ szervezetünk ubiquiter alkotóeleme, az egyik legstabilabb ROS. Kis reaktivitása, alacsony prooxidáns kapacitása miatt önmagában nem vesz részt az intracelluláris lipid-, protein és DNS oxidációs folyamatokban (43). Ultraibolya sugárzás és átmeneti fémionok – úgymint a Fe²⁺ ion – jelenlétében azonban a Fenton reakció során a rendkívül reakcióképes [•]OH-vá képes átalakulni (43):



A H₂O₂ legvalószínűbb endogén forrása a szuperoxid szabad gyök (O₂^{•-}) dizmutációja. A ROS-ok legfőbb intracelluláris forrásai a mitokondriumok, így a O₂^{•-} mellett a H₂O₂ képzésében is a mitokondriumoknak van kiemelt szerepük. A citoszol H₂O₂ termelésében fiziológias körülmények között a peroxiszómák játszanak szerepet. Emellett az endoplazmatikus retikulum monooxygenázai (pl. a citokróm P450 enzim) is részt vesznek a O₂^{•-} mellett a H₂O₂ képzésében is (33), valamint a membránhoz kötött NADPH-oxidáz által képzett O₂^{•-} egy része is H₂O₂-vé dizmutál.

A nitrogén-monoxid szintáz enzim (NOS) által katalizált nitrogén-monoxid (NO) szintézis során az oxigén-felhasználás melléktermékeként is keletkezik O₂^{•-}, mely ezt követően spontán, vagy a SOD által katalizált reakcióban a kevésbé reaktív H₂O₂-vé dizmutálódik.

A O₂^{•-} szabad gyököt semlegesítő SOD két O₂^{•-} közötti reakciót katalizálva semlegesíti a reaktív molekulákat:



A H₂O₂ semlegesítésében a kataláz enzim játszik kiemelkedő szerepet.



A H_2O_2 hagyományos értelemben véve nem tekinthető szabadgyöknek, a szakirodalom azonban a reaktív oxigén származékok közé sorolja. A magas H_2O_2 szint számos kórképpel – többek között a Parkinson kórral – hozható összefüggésbe (44). Magas plazma H_2O_2 -szintet igazoltak magas vérnyomásban szenvedő betegeknél is (45). Diabétesz mellitusban a fokozott oxidatív stressz köztudottan jelentős H_2O_2 termeléssel jár, mely a legkülönbözőbb jelátviteli útvonalakon keresztül a sejtek apoptózisát indukálja és szerepet játszik a diabétesz és szövődményeinek kialakulásában. A hiperglikémiás állapot a retinában a H_2O_2 -szint emelkedését okozza (46), emellett aorta simaizomsejtekben is a H_2O_2 szintjének növelésén keresztül nekrotikus sejthalált indukál, melynek fontos szerepe lehet a diabéteszes érszövődmények kialakulásában (47). A H_2O_2 neuromodulátor, second messengerként betöltött szerepe is jól ismert (48,49).

1988-ban sikerült azonosítani egy endotél által termelt anyagot, mely a kiserekben az érfal mélyebb rétegeibe szabadon diffundálva a vaszkuláris simaizomzat hiperpolarizációját és ezáltal endotél függő relaxációját váltja ki (50,51). Míg az endotél eredetű NO a nagyobb erek, addig az újonnan felfedezett, sokáig ismeretlen természetű molekula a kis rezisztenciaerek endotélfüggő vazodilatációját okozza. Az ismeretlen molekula sokáig mint endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) volt ismeretes. Feltételezték, hogy az EDHF egy olyan, feltételezhetően ROS természetű vazodilatátor molekula, amely az eNOS enzim működése során keletkezik. Az endotélben számos ROS keletkezik, úgymint $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO, $^{\bullet}\text{OH}$, peroxinitrit.

A későbbiekben állatkísérletek és humán vizsgálatok egyaránt igazolták, hogy az endotél eredetű H_2O_2 egy EDHF, mely endotélfüggő vazodilatációt kiváltó hatása révén fontos szerepet játszik a vazomotor tónus szabályozásában (50,51,52,53). Az endoteliális H_2O_2 az eNOS enzim működése során keletkező $\text{O}_2^{\bullet-}$ spontán és enzimatisz dizmutációja során keletkezik. A SOD enzimnek az endotélben három izoformája található meg, melyek közül legnagyobb arányban a réz-cink-SOD (Cu-Zn SOD) tehető felelőssé az intracelluláris dizmutációért. Az extracelluláris SOD pedig az extracelluláris $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ot dizmutálva a NO szubendoteliális diffúzióját segíti elő. A $\text{O}_2^{\bullet-}$ önmagában ugyanis a NO-dal peroxinitritet képez, ezáltal a NO eredetű endotél dependens vazodilatációt gyengíti (53).

A H_2O_2 endoteliális szintézisét fokozza a megnövekedett intracelluláris kalcium szint és stimulálhatja a vaszkuláris nyíróerő is. Az EDHF okozta érfali simaizom hiperpolarizáció és vazodilatáció katalázal gátolható, ami az EDHF és a H_2O_2 egyezését támasztja alá. Mind a

NO, mind a H_2O_2 a szolubilis guanilat-cikláz (sGC) enzim aktiválása révén a ciklikus guanozil-monofoszfát (cGMP) képződést serkenti. A cGMP pedig protein kinázok és ionszatórnák működésének befolyásolásán keresztül az érfali simaizomzat tónusának szabályozásáért és a trombocita aggregáció gátlásáért felelős (34).

A legújabb kutatások szerint az eNOS enzim a nagyerekben a NO termelésért, a kis rezisztencia erekben pedig elsősorban az EDHF természetű H_2O_2 képzésért tehető felelőssé, ezáltal hozzájárulva a kardiovaszkuláris homeosztázis fenntartásához (53). Az ateroszklerózis számos rizikófaktora így mind a NO, mind az EDHF-mediálta vazodilatációt károsítja.

A H_2O_2 közismerten szerepet játszik különböző anti-inflammatorikus folyamatokban, bár magas szintje károsítja az endogén strukturákat is (54).

4.1.4 A H_2O_2 detektálás lehetőségei

A ROS-ok biológiai mintákban való mérésére számtalan különböző módszert fejlesztettek ki. A radioizotópos jelölés, az elektron spin rezonancia (ESR) és a spektrofotometriás kimutatás mellett az elektrokémiai módszerekkel történő detektálás és a fluoreszcencián alapuló mérés terjedt el a gyakorlatban (55,56,57,58,59). Mivel a H_2O_2 egy viszonylag stabil ROS és könnyen diffundál a sejtmembránokon keresztül, ezért a plazmából kimutatható. Frew és munkatársai egy spektrofotometriás eljárást dolgoztak ki, mely vizes közegben alacsony koncentrációjú H_2O_2 detektálást tesz lehetővé (58). Deskur és munkatársai az előbbieken említett spektrofotometriás eljárást alapul véve mérték a H_2O_2 plazmaszintjét testmozgást megelőzően és azt követően kardiológiai rehabilitáció alatt álló betegeknél. Méréseik alapján a plazma nyugalmi H_2O_2 -koncentrációja 5-8 $\mu\text{mol/l}$ volt (59).

A későbbiekben kifejlesztett, fluoreszcencia mérésén alapuló módszerek erősen szenzitív, kevésbé invazív és biztonságos detektálási módszerek bizonyultak (55,56,57). Az 1980-as évekig ezek a módszerek csak in vitro fixált mintákban voltak alkalmazhatók, in vivo nem. Később azonban olyan specifikus molekulák kerültek használatba, melyek in vivo körülmények között reakcióba lépnek a ROS és RNS természetű molekulákkal ami együtt jár valamely fotokémiai jellemzőjük megváltozásával (a fluoreszcencia erőssége, az excitációs/emissziós hullámhossz). Detektálási eljárásként a fotonindukálta elektron transzfer (PeT) és a fluoreszcens rezonancia energiatranszfer (FRET) használható. A legtöbb fluoreszcens reagens, mint például a dichlorodihydrofluorescein és a dihydrorhodamin azonban nem szelektívek, így többféle oxidáló ágenssel - mint a H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO - képesek

oxidatív reakcióba lépni. Ennek megfelelően ezek a próbák nem egy specifikus ROS, hanem az intracelluláris oxidatív stresszfolyamatokban szerepet játszó oxidáló ágensek széles skálájának detektálására alkalmasak (57).

A H_2O_2 elektroaktív molekula, így mérésére amperometriás enzimelektrodokkal történő voltametriás méréseket is kifejlesztettek (60,61). Különböző stratégiákat dolgoztak ki a H_2O_2 -mérés szelektivitásának növelésére és az alsó méréshatár csökkentésére biológiai mintákban. A munkaelektrod felszínén kialakított méretkizárásos membránréteg (62) és szelektív áteresztőképességű bevonóréteg, mint például a Nafion® réteg az elektrod szelektivitását javítani képes.

Elektrokatalizátorok (63,64,65), direkt elektrontranszferáló molekuláris bevonatok (66,67) használatával csökkenthető a kimutathatósági küszöb. Emellett tormaperoxidáz – mint másodlagos enzim – beépítésével is csökkenthető a H_2O_2 detektálásához szükséges elektrodpotenciál (68).

Több tanulmány foglalkozik a H_2O_2 in vivo mérésével. Patkány corpus cavernosumában egy szénszálas microelektrod segítségével történő H_2O_2 méréssel Meulemans megerősítette, hogy a H_2O_2 endogén vazoaktív molekulaként viselkedik (69).

Kulagina és Michael megnövelt szenzitivitású szénszálas microelektrod segítségével mérte a H_2O_2 -szintet altatott patkány agyi extracelulláris terében (70). Tanulmányaikban a szénelektrodot immobilizált tormaperoxidázzal és egy keresztkötésű redox polimerrel vonták be, mely elektronközvetítő molekuláris mikroszálként működik. A mikroszálas bevonat aszkorbinsav-oxidázt is tartalmazott, melynek az aszkorbinsav interferencia kivédése a célja.

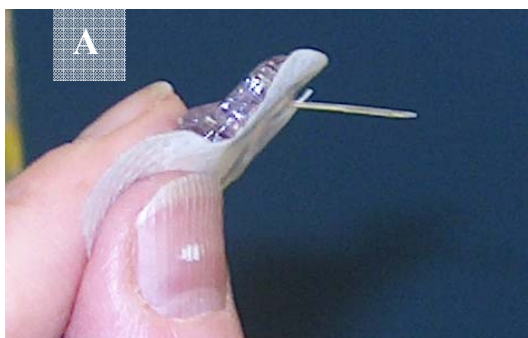
4.2. Célkitűzések

Vizsgálatunk célja egy, a mindennapi gyakorlatban használt elektroenzimátikus glükóz-szenzor glükóz-oxidáz enzimének inaktiválásával egy új, H_2O_2 -ra specifikus szenzor létrehozása volt. Ezt követően az így létrehozott H_2O_2 -szenzor szenzitivitását, specificitását és a H_2O_2 - detektálás alsó méréshatárát vizsgáltuk. A kísérletek következő fázisában az újonnan létrehozott szenzor segítségével in vitro borjú szérum albumin (BSA) és humán plazmamintában, valamint egészséges és diabéteszes patkányban terveztük a H_2O_2 -szint in vivo mérését.

4.3. Kísérleti körülmények

4.3.1 Eszközök, módszerek

Kísérleteinkhez a MiniMed Medtronic (Minimed Medtronic, USA) CGMS készülékéhez tartozó elektroenzimátikus glükóz szenzort használtuk. A tű alakú glükóz szenzor az intersticiális glükóz koncentráció több napig történő folyamatos monitorozására alkalmas. A szenzor az amperometriás detektáláshoz szükséges mindhárom elektródot tartalmazza, felépítéséről és készítésének technológiai háttéréről pontos információval nem rendelkezünk (8. ábra).



8. ábra: A CGMS készülés glükóz szenzora (A panel). A subcutan implantálható tűelektród mikroszkópikus szerkezete (B panel) A B panelen fénymikroszkóp alatt vizsgálva látható a mikroelektród 3 alkotóeleme: a munka-, a referencia és az ellenelektród.

Voltammetriás méréseink során a szenzorhoz kapcsolódó (a detektált amperometriás adatokat intersticiális cukorszintté konvertáló és adattároló) CGMS készüléket egy elektrokémiai mérőállomással helyettesítettük. A mérésekhez a GPES 4.9.009 for Windows (Eco Chem B.V., The Netherlands) softwer által vezérelt AUTOLAB 12 elnevezésű elektrokémiai mérőállomást alkalmaztuk. A szenzor és a mérőállomás közti összeköttetést speciális, saját készítésű „összeköttetéssel” oldottuk meg. In vitro vizsgálatainkhoz 5-25 cm³ űrtartalmú mérőedényeket használtunk. Néhány esetben a szenzor saját elektródjait különálló, ezüstszálból készült referenciaelektróddal (1mm átmérőjű) és platinaszálból készült ellenelektróddal helyettesítettük (0,5 mm átmérőjű). In vitro vizsgálatainkhoz teflonbevonatú keverőruddal működő mágneses keverőt használtunk (Radelkis, Budapest, típuszám: OP 951).

4.3.2. Vegyszerek

Valamennyi kísérletünk során alkalmazott oldat kétszeresen desztillált víz felhasználásával készült. A 7.4-es pH értékű fiziológiás foszfátpuffer oldat (PBS oldat) a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Egyetemi Gyógyszertárában készült. A glükóz-oxidáz enzim inaktivációjához PBS oldatban oldott 5-szulfoszalicilsav-2-hidrátot használtunk (SSA; Reanal, Hungary, 02531-1-08-30). A H₂O₂-t a Molar Chemicals-től (Hungary, 03650-203-340), a BSA-t pedig a Sigmától (USA, A7030) szereztük be. A hűtött humán plazmaminták a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Klinikai Laboratóriumából származtak. In vivo kísérleteinkhez használt patkányok altatását uretánnal végeztük (Spectrum 3D, Hungary, 3.21020). A glükózoldatokat a kísérleteket 12 órával megelőzően készítettük el és hűtőben tároltuk. A 30%-os H₂O₂-oldat desztillált vízzel való hígításával állítottuk elő a 0,3%-os H₂O₂-oldatot és a hígított oldat koncentrációját iodometriás titrálással határoztuk meg. Az oldatot ezt követően az amperometriás elektród kalibrálásához tovább hígítottuk. Kísérleti állataink streptozotocin beadását követően váltak diabéteszessé, a streptozotocint és a glükózt a Flukától szereztük be (Germany, 85882 és 49161).

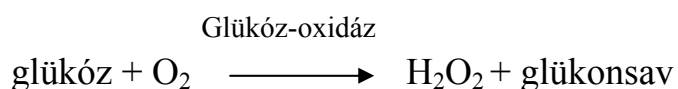
4.3.3. Állatkísérletek

Állatkísérleteinket a Pécsi Egyetem Állatkísérleti Bizottságának engedélyével végeztük. Kísérleteinkhez 250-300g tömegű, három hónapos életkorú hím Wistar patkányokat alkalmaztunk. Az állatokat standard ketrecekben tartottuk, az állatok táplálék-, és folyadékbevitelét nem korlátoztuk. A kísérleti állatok egy részét intraperitoneálisan beadott streptozotocinnal kezeltük ($70\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). A streptozotocin ROS-ok segítségével szelektíven pusztítja a hasnyálmirigy β -sejtjeit.

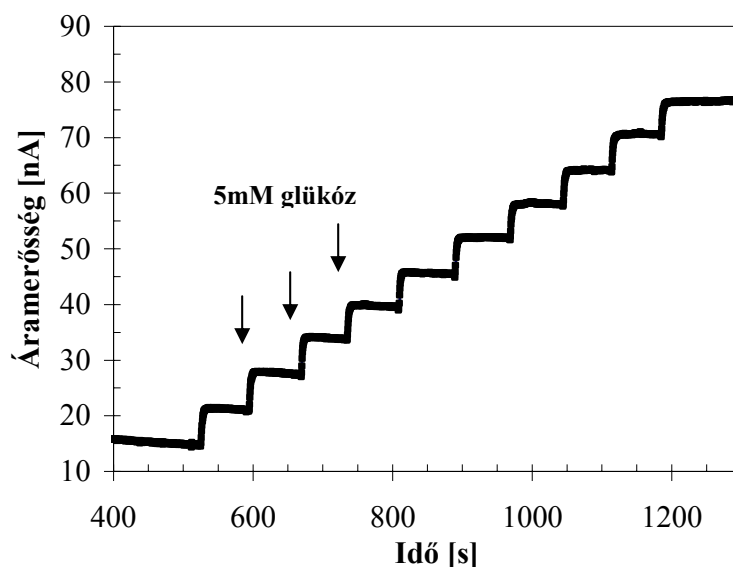
A megkezelt patkányok vércukorszintjét naponta ellenőriztük, és - az irodalmi adatoknak megfelelően - azon patkányokat, melyek vércukorszintje meghaladta a 13 mM koncentrációt - diabéteszesnek tekintettük. Kísérleti állatainkban a streptozotocinnal való kezelést követően átlagosan 7-15 nap alatt alakult ki a fenti kritériumok szerint diabétesznek megfelelő vércukorszint. A vércukorszint méréséhez Ascensia Entrust glükométert használtunk. A patkányok anesztéziájához $1,56 \text{ mg/kg}$ dózisban intraperitoneálisan beadott uretánt alkalmaztunk. Esetenként az említettnél nagyobb dózisú uretán beadása is szükségessé vált a megfelelő anesztézia biztosításához. Az uretán által indukált testhőmérséklet-csökkenés megelőzése céljából a kísérleti állatokat betakarással védtük. A szenzor implantációjának tervezett helyét leborotváltuk és a beültetést követően a szenzort tapasztokkal gondosan az állatok bőréhez rögzítettük. A beültetést megelőzően valamennyi szenzort mind H_2O_2 -ra, mind glükózra kalibráltuk.

4.4. Eredmények

Elsőként a mikroszenzor glükózmérő kapacitását vizsgáltuk. Ennek során 20 cm³ PBS puffert tettünk egy mérőedénybe, mely mérési cellaként működött. A szenzort az oldatba helyeztük és intenzív keverés, valamint 0,7 V munkaelektrod-potenciál mellett detektáltuk az amperometriás áramjel időbeni változását. A kezdeti, bekapcsoláskor mért magasabb áramjelet követően az áramerősség lassú csökkenést mutatott. Az egyensúlyi állapot elérését követően a 10M koncentrációjú glükózoldatból 10 ul-t adtunk az oldathoz. Az áramjel emelkedett, jelezve, hogy az alábbiakban mutatott reakciónak megfelelően H₂O₂ keletkezett.



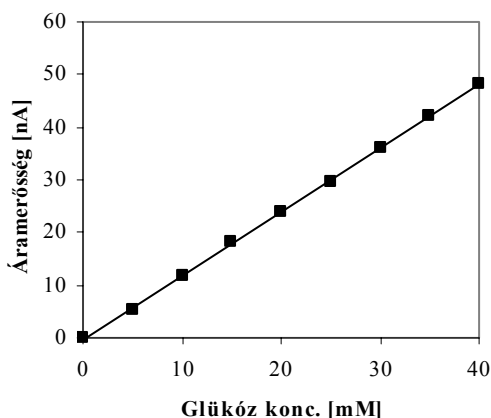
Azonos mennyiségű glükózoldat többszöri, ismételt hozzáadásával az áramjel lépcsőről-lépésre megközelítőleg azonos mértékben emelkedett, ahogy az a 9. ábrán is látható. Ezzel szemben 10 ul térfogatú 10mM koncentrációjú aszkorbinsav oldat többszöri hozzáadásának hatására az áramjel nem emelkedett, amely a glükóz-szenzor kitűnő szelektivitását jelzi.



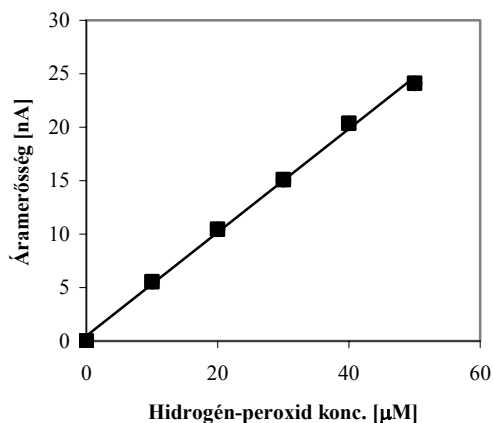
9. ábra: Egy kiválasztott szenzor glükóz érzékenységének vizsgálata amperometriás módszerrel.

Ugyanazon glükózmennyiség hozzáadásának hatására – a glükóz végkoncentrációt lépésenként 5mM-lal emelve - az áramjel lineáris növekedést mutat.

További kísérleteink során a 20 cm³ koncentrációjú friss PBS oldatot tartalmazó mérőedénybe visszahelyeztük a korábbi kísérletünk során vizsgált szenzort és 0,7 V munkaelektrod potenciál mellett ismét megvártuk a csökkenő áramjel egyensúlyi állapotának elérését. Ezt követően a PBS oldat állandó keverése mellett 10ul térfogatú 10mM koncentrációjú H₂O₂ oldat többszöri ismételt hozzáadásával detektáltuk az áramjel változását. A 10. ábrán azonos szenzorral végzett kísérletünk során a többszöri, azonos mennyiségű glükózoldat (a görbe), illetve H₂O₂-oldat (b görbe) többszöri, ismételt hozzáadásával nyert koncentráció-áramerősség kalibrációs görbék láthatók. Az elvárásoknak megfelelően a mikroelektrod glükóz-, és H₂O₂-szenzitivitása közti különbség jelentős, a H₂O₂-szenzitivitás megközelítőleg 400-szor nagyobb mint a szenzor glükóz-szenzitivitása.



a,



b,

10. ábra: Egy szenzor glükóz-, és H_2O_2 -érzékenységének összehasonlítása

a: glükóz-érzékenység kalibrációs görbéje, *b:* H_2O_2 -érzékenység kalibrációs görbéje

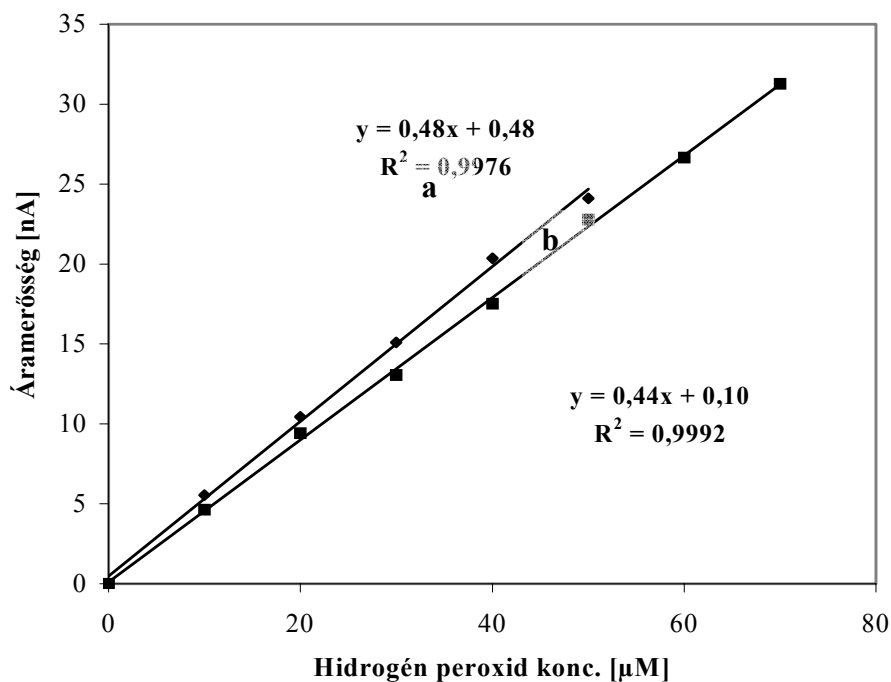
Elképzelésünk szerint ahhoz, hogy a szenzor alkalmas legyen glükóz jelenlétében a H_2O_2 -koncentráció mérésére, a szenzor felszínén immobilizált formában jelen lévő glükóz-oxidáz enzim inaktiválásával a szenzort glükóz mérésére alkalmatlanná kell tenni. A glükóz-oxidáz köztudottan egy olyan enzim, amely kiváló stabilitással rendelkezik (71). A glükóz-oxidáz enzim inaktiválását a legkülönbözőbb módszerekkel próbálkoztuk kivitelezni. Elsőként a glükóz-szenzort 60 °C-ra felmelegített PBS pufferoldatba helyeztük egy órára, melynek hatására a szenzor szenzitivitása érdemben nem változott, ezt követően más szenzorokat 1%-os, illetve 10%-os H_2O_2 -oldatba (72), illetve bromid ionokat tartalmazó-, valamint az irodalomban is említett diperoxovanadát oldatba helyeztünk. Azonban mindezen inaktivációs kezeléseket követően részleges glükóz-oxidáz enzim aktivitás maradt vissza, ami a glükózzal végzett kalibrációs vizsgálat ismételt elvégzésével volt kimutatható. Ez az eredmény a szenzor felszínén immobilizált enzim kiváló stabilitását erősíti meg. Magasabb hőfokra való melegítéssel nem próbálkoztunk, mert ez már a szenzor irreverzibilis szerkezeti károsodását okozhatta volna. Egyéb inaktiváló ágensek, mint például a higany, az ólom vagy más nehézfémionok inaktiváló hatásával sem próbálkoztunk, mert az így inaktivált szenzorok ezen inaktiváló ágensek kifejezett mérgező hatása miatt további in vivo vizsgálatokban még sikeres enzim inaktivációt követően sem lettek volna felhasználhatóak.

A szulfoszalicilsav (SSA) ismertén egy fehérje precipitáló ágens. 20%-os oldatát a klinikai laboratóriumok rutinszerűen alkalmazzák emberi vizelet fehérjetartalmának

kimutatására. Irodalmi adatok alapján feltételezhető volt, hogy az enzim inaktivációjához 5%-os SSA oldat elegendő lesz.

További kísérleteink során a szenzort eltérő időtartamra 5%-os SSA oldatba helyeztük. Ezt követően pufferoldattal alapos keverés mellett átöblítettük, majd 10 percre a pufferoldatba helyeztük és ezt követően ellenőriztük az amperometriás glükóz választ. 30 perces inaktivációs idő elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a glükóz-oxidáz enzim katalitikus aktivitását – és következményesen a szenzor glükóz-érzékenységet - teljesen megszüntesse. Az SSA oldatban hosszabb ideig történő inkubációnak nincs károsító hatása a szenzor H_2O_2 -detektáló kapacitására, igaz a szenzor érzékenységének szempontjából további előnnyel sem bír.

A 11. ábra egy szenzor H_2O_2 -érzékenységét ábrázolja az SSA-val történő enzim inaktiváció előtt (*a jelű kalibrációs görbe*) és az inaktiváció után (*b jelű kalibrációs görbe*). Az inaktivációt követően a glükóz hozzáadások hatására nem jelentkezett áramjel emelkedés. Ehhez hasonlóan az aszkorbinsav hozzáadása sem változtatta meg az áramjelet, amely azt jelzi, hogy az enzim-inaktiváció nem károsította a szenzor szelektivitását. Amint eredményeink mutatják, az enzim-inaktiváció az amperometriás mikroszenzor H_2O_2 -érzékenységét sem változtatta meg szignifikáns mértékben.



11. ábra: Egy szenzor H_2O_2 -érzékenysége az enzim-inaktivációt megelőzően (**a** jelű kalibrációs görbe) és az inaktivációt követően (**b** jelű kalibrációs görbe). Koncentráció-áramerősség kalibrációs görbék.

Ezt követően az amperometriás elven működő inaktivált H_2O_2 -szenzor megbízhatóságát, a H_2O_2 -mérési eredmények reprodukálhatóságát vizsgáltuk. Amperometriás méréseinket továbbra is folyamatos keverés alatt álló, 20 cm³ térfogatú PBS oldatban végeztük. Kísérleteink során ismert koncentrációjú H_2O_2 -oldatok hozzáadását követő áramjelnövekedést detektáltuk, majd öt mérés eredményének átlagát értékeltük. A szenzorral mért H_2O_2 -koncentráció meghatározásához a korábban készített kalibrációs görbét használtuk. Az ismert és a mérési eredményként kapott koncentráció értékeket összevetettük egymással és az így kapott százalékos „recovery” értékeket az 4. táblázatban tüntettük fel. Eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy az általunk létrehozott H_2O_2 -szenzor jól reprodukálható mérési eredményeink alapján pontos és megbízható H_2O_2 -detektálást tesz lehetővé.

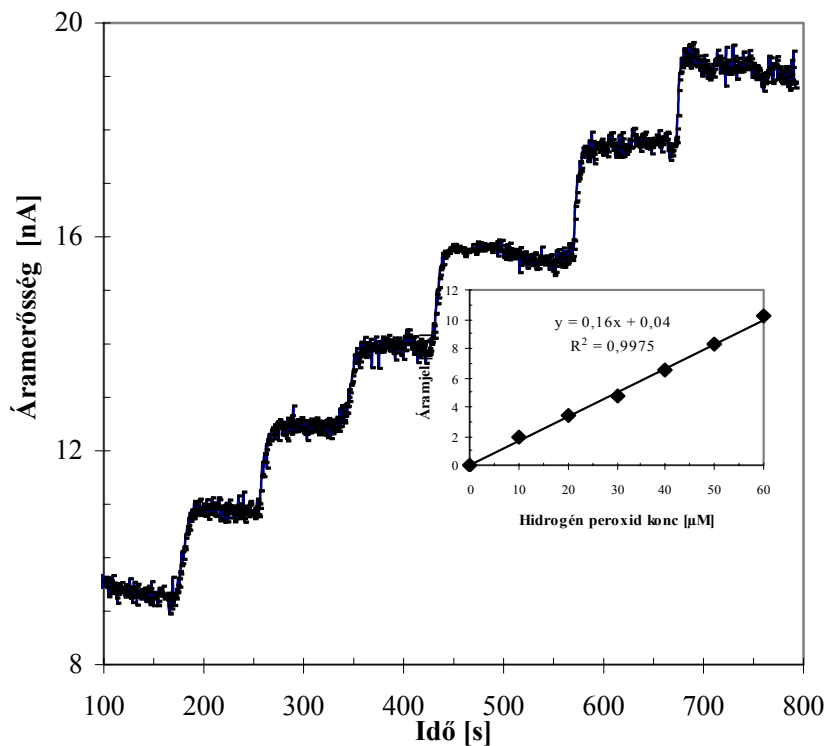
4. táblázat: A H_2O_2 recovery vizsgálat eredménye (öt különböző H_2O_2 -szennővel végzett mérés átlageredményei).

Végkoncentráció (μM)	Recovered \pm SD (μM)	Recovery \pm SD (%)
20	21,8 \pm 0,5	108,8 \pm 2,4
60	58,1 \pm 3,5	96,8 \pm 5,9
120	117,7 \pm 6,1	98,1 \pm 5,1
200	195,3 \pm 8,1	97,6 \pm 4,1
300	295,4 \pm 10,9	98,5 \pm 3,6

A ROS-ok nagyfokú reaktivitásuknak köszönhetően biológiai mintákban csak igen alacsony koncentrációban fordulnak elő. Irodalmi adatok szerint a H_2O_2 mikromolós nagyságrendben fordul elő az emberi szervezetben. Emiatt vizsgálatokat folytattunk az általunk vizsgált H_2O_2 -szennő alsó méréshatárának meghatározására. 20 cm^3 keverés alatt álló PBS oldatban 0,7 V munkaelektrod potenciál mellett amperometriás méréseket végeztünk. Az elektrodpotenciál ráadását követően 30 perc múlva mért áramjelet tekintettük alapvonalnak és meghatároztuk a 2 perc alatt 200/min frekvenciával regisztrált egyensúlyi áramjelértékek szórását (σ), mely a zajszintnek felel meg. A zajszint háromszorosának megfelelő áramjelértéket (3σ érték) tekinthetjük alsó méréshatárnak. Ezután az áramjel- H_2O_2 -koncentráció összefüggését az alacsony koncentrációtartományban vizsgáltuk. A vizsgálat során a frissen készített 1mM koncentrációjú H_2O_2 oldatból több alkalommal 10ul mennyiséget adtunk a mérőedényben található pufferoldathoz. Az így kapott kalibrációs görbét extrapoláltuk az alacsonyabb mérési értékek tartományára és a 3σ -nak megfelelő áramjelet az extrapolált szakaszra vetítettük. A 3σ értéknek megfelelő áramjel és az extrapolált kalibrációs görbe metszéspontjának megfelelő H_2O_2 koncentrációt fogadtuk el a H_2O_2 mérés alsó méréshatárának, melynek értéke vizsgálatunk alapján megközelítőleg $5\mu\text{M}$.

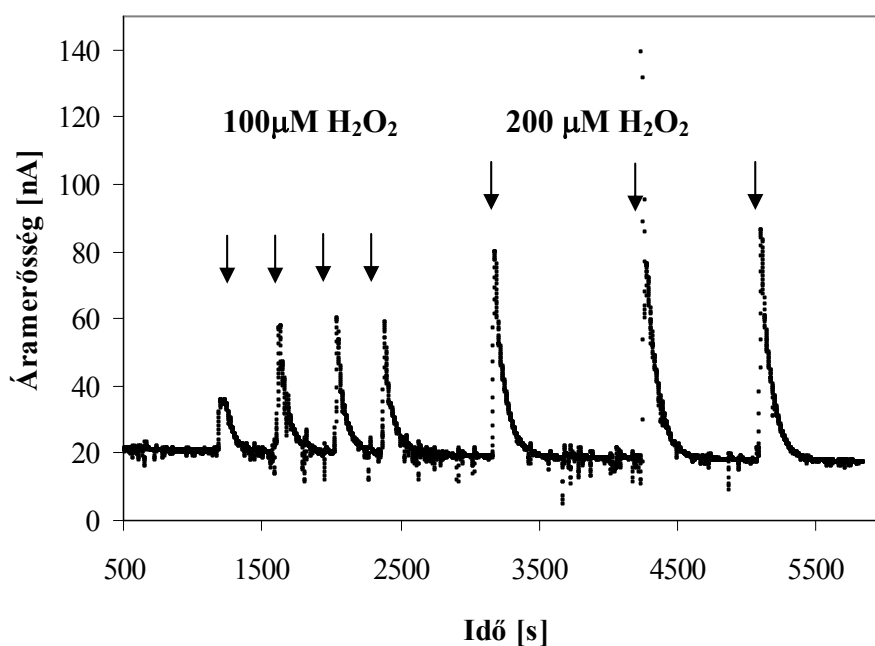
A H_2O_2 a rendkívül reakcióképes ROS-ok között egy viszonylag stabil ROS. A stabilitását két különböző közegben vizsgáltuk az előállított amperometriás elven működő H_2O_2 -mikroszenzor segítségével. Az első esetben az ismert szabadgyökfogó hatású (73) BSA-

t 35g/l koncentrációban tartalmazó, 20 cm³ térfogatú PBS oldatot pipettáztunk a mérőedénybe, majd az oldatot intenzív folyamatos keverés alatt tartva 0,7 V elektródpotenciál mellett detektáltuk a létrejövő áramjelet. Az egyensúlyi állapot elérését követően 10ul térfogatú, 1mM koncentrációjú H₂O₂-oldat többszöri hozzáadását követően végeztünk amperometriás méréseket. Eredményeinket a 12. ábra szemlélteti. Ahogy az az ábrán is látható, minden egyes H₂O₂-oldat hozzáadását követően az áramjel elér egy egyensúlyi értéket, de az áramjel-emelkedés kisebb mértékű az egyszerű PBS oldatban észleltnél. A háttérben a BSA aktuális szabadgyökfogyó kapacitása és nagyobb viszkozitása állhat.



12. ábra: Egy PBS alapú 35g/l koncentrációjú BSA oldatban végzett amperometriás mérésünk eredménye. A H₂O₂ koncentrációja minden egyes hozzáadás alkalmával 10µM-lal emelkedett. A beszúrt kis ábrán ugyanezen mérési eredmények alapján nyert kalibrációs görbe látható.

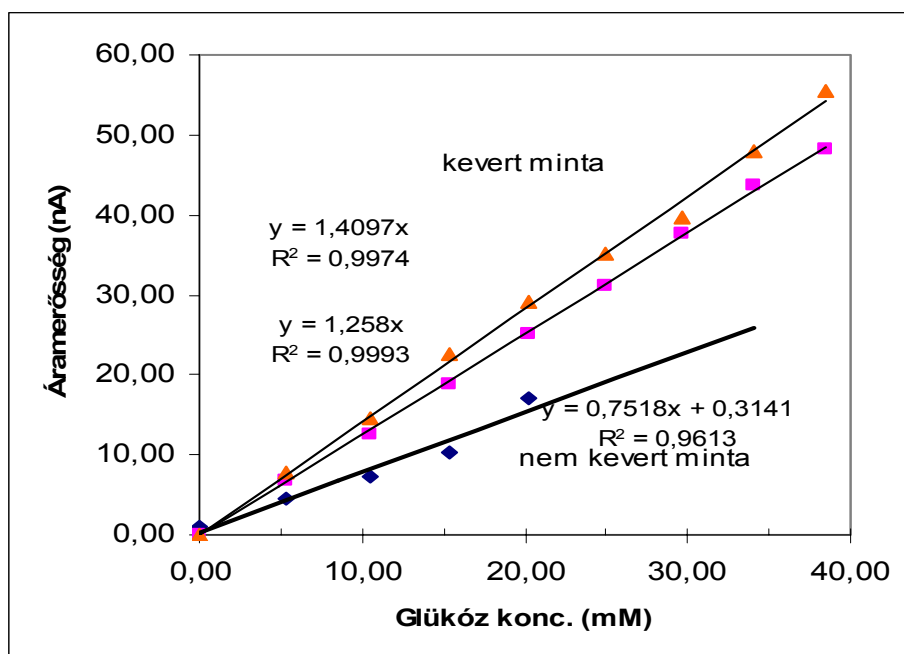
A fenti kísérletet humán plazmával megismételve eltérő eredmények születtek. A 0,7 V munkaelektrod potenciál mellett kevert humán plazmaoldatban mért áramjel-idő összefüggés az 13. ábrán látható. Ebben az esetben 100 és 200 μl 10 mM koncentrációjú H_2O_2 -oldatot adtunk a mérőedényben lévő humán plazmamintához. Átmeneti áramjel csúcsok voltak detektálhatók, melyek gyors lecsengése a H_2O_2 gyors lebomlására utal. A nagyobb koncentrációjú H_2O_2 -oldat hozzáadása magasabb áramjel csúcsot eredményezett, bár humán plazmamintában a H_2O_2 -oldat hozzáadásakor keletkező áramjel jóval kisebb volt a BSA oldatban mért értékeknél és a H_2O_2 életideje is (ROS természetének megfelelően) nagyon rövidnek tűnt. Kísérletünk a humán plazma igen hatékony antioxidáns kapacitását támasztja alá.



13. ábra: Humán plazmával végzett vizsgálatunk eredménye. A H_2O_2 koncentrációját kezdetben 100 μM -al, majd 200 μM -al növeltük minden egyes hozzáadás alkalmával. Az áramjel-válasz gyorsan lecsengő „spike-ok” formájában jelentkezett. Az ábrán egy amperometriás regisztrátum látható.

Valamennyi, eddigiekben részletezett in vitro mérésünket folyamatos keverés alatt álló, 20 ml térfogatú oldatban végeztük, amely jelentősen nagyobb volumenű, mint a szenzort in vivo körülvevő folyadék volumene. Az elektród a szubkután zsírszövetbe történő implantációját követően kapcsolatba kerül a többé-kevésbé nyugalomban lévő extracelluláris mátrixszal.

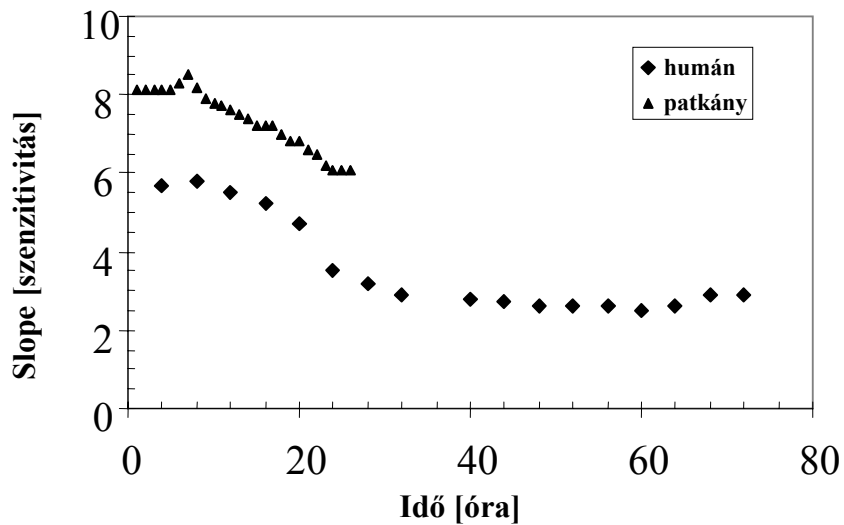
Összehasonlítottuk keverés alatt álló és nem kevert PBS oldatban ismert, azonos mennyiségű glükózoldat hozzáadásakor keletkező kalibrációs görbéket (14. ábra). Az in vivo körülmények között végzett glükózméréskor várt elektrokémiai szignál a kevert és a nem kevert mintákban nyert eredmények közötti lehet.



14. ábra: A glükóz-szenzorok glükóz-érzékenysége kevert és nem kevert mintákban. Glükóz koncentráció-áramerősség kalibrációs görbék.

Utolsó kísérleteink során a H_2O_2 -elektrodot diabéteszes és egészséges patkányok hasbőre alá implantáltuk és az áramjelet hosszabb-rövidebb ideig detektáltuk. Míg a diabéteszes patkányok vércukorszintje több mint kétszerese volt az egészséges állatokban mért értéknek, addig az implantáció helyén mért H_2O_2 -szintek között nem volt szignifikáns különbség, és a detektált áramjel igen kicsi volt és folyamatos csökkenést mutatott. Nagyobb mennyiségű H_2O_2 lokális intraperitoneális beadását követően mérhető áramjel változást sajnos nem tudtunk detektálni.

Néhány előzetes vizsgálatunk során glükózoldat intraperitoneális befecskendezését követően nagyobb átmeneti áramjelet tudtunk detektálni a patkányba ültetett glükóz-szenzorok segítségével. A H_2O_2 -szenzor in vivo felhasználhatóságának megítéléséhez azonban további vizsgálatok szükségesek. Az implantált H_2O_2 -szenzor esetén detektálható áramjel lassú, de folyamatosan csökkenő tendenciát mutat. Ugyanezen csökkenő tendencia észlelhető az eredeti, aktív enzimet tartalmazó glükóz-érzékeny mikroszenzor esetén is. A glükóz szenzor megfelelő működéséhez időszakos külső ujjbegyi glükóz-mérési eredmények bevitelét igényli kalibrációs céllal, melynek segítségével a kalibrációs faktor folyamatos korrekcióját végzi. A 15. ábra a glükóz-szenzor glükóz-szenzitivitásának időbeni csökkenését mutatja, de minden valószínűség szerint a H_2O_2 -szenzor szenzitivitása legalább ugyanilyen mértékben csökken in vivo körülmények között.



15. ábra: A szenzitivitás időfüggő csökkenése egy, a szubkután zsírszövetbe implantált glükóz-szenzor esetén. Diabéteszes betegbe (◆) és altatott patkányba (▲) implantált glükóz szenzor (a „slope” értéke a szenzor aktuális glükóz-érzékenységet jelenti és egyben megegyezik a kalibrációs konstanssal. Aktuális értékét a CGMS készülékhez tartozó szoftver önmaga kalkulálja.)

4.5 Megbeszélés

A reaktív oxigén származékok az utóbbi időben a tudományos kutatás mellett a klinikum számos területén is az érdeklődés középpontjába kerültek. ROS-ok mindenütt nagy számban előfordulnak, növényekben, állatokban és az emberi szervezetben egyaránt. Sokrétű károsító hatásuk mellett nélkülözhetetlenek az életben maradásunkhoz, hiányukban az infekciók elleni védekezésünk összeomlik. Életünk folyamán a ROS-mediálta oxidatív károsodások kumulálódnak – melyek ellen az antioxidáns védekezésünk az évek előrehaladtával egyre gyengül – és végül az életkorral egyre gyakoribbá váló daganatos, neurodegeneratív betegségek és számos más kórkép kialakulásához vezetnek (74). Mindez talán az evolúció mellékterméke. A ROS-ok életünk reprodukív korszakában az infekciók elleni védekezés és a jelátviteli folyamatok részeseként nélkülözhetetlenek életben maradásunkhoz, majd a későbbi években inkább kumuláló károsító hatásuk kerül előtérbe, amely ellen az antioxidánsok fokozott bevitele sem nyújt segítséget. Szervezetünkben a redox homeosztázis szabályozása ugyanis rendkívül szigorúan szabályozott, általunk kevésbé befolyásolható módon történik.

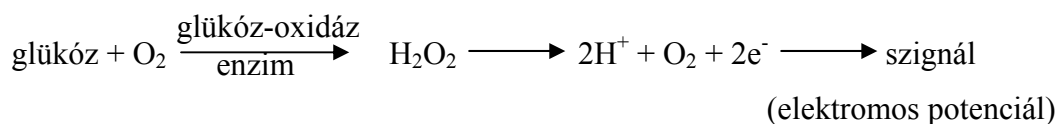
A H_2O_2 az egyik legstabilabb ROS. Ezen tulajdonsága teszi lehetővé, hogy a szabadgyök-képződés markereként az oxidatív stressz in vivo detektálására használjuk fel.

Az emberi szervezetben mérhető mennyiségéről nagyon kevés adattal rendelkezünk. A közelmúltban sertés koronária mikroerekben elektron spin rezonancia segítségével sikerült direkt endoteliális H_2O_2 termelést kimutatni. Az endotél eredetű H_2O_2 becsült koncentrációja mikromolos nagyságrendű. Kimutatták, hogy az endoteliális H_2O_2 a koronária mikrocirkulációra hatva jelentős kardioprotektív hatással is bír, beleértve a koronária autoregulációt, és az iszkémiás-reperfúziós károsodások elleni védelmet is (53).

Ma már ismert, hogy az emberi szervezetben betöltött szerepe igen sokrétű. Prooxidáns, az endogén struktúrákat károsító negatív hatása mellett a szervezet infekciók elleni védekezésében, a szignál transzdukciós folyamatokban - mint másodlagos jelátvivő molekula -, valamint az endotél-függő vazodilatációban – mint EDHF – is kiemelt, pozitív szerepet játszik. Folyamatos, in vivo monitorozása mind az alap kutatásban, mind a klinikai gyakorlatban igen nagy jelentőséggel bírna.

A diabéteszes betegek személyre szabott antidiabetikus terápiájának kialakításához az intersticiális glükózkoncentráció monitorozását ma már a klinikai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazzuk. Méréseink során egy humán alkalmazásra kifejlesztett, kereskedelmi forgalomban lévő glükóz-szenzort alkalmazunk (75). A szenzor egy amperometriás elven

működő mikroelektrod, amely glükóz-oxidáz enzimet használ katalizátorként, és a glükóz enzimatis oxidációja során keletkező H₂O₂-t szelektíven detektálja (16. ábra)



16. ábra: A CGMS készülék működésének elve

A glükóz-szenzor pontos szerkezeti felépítését nem ismerjük. Fénymikroszkópos vizsgálataink alapján biztonsággal állíthatjuk, hogy a szenzor mikroelektrodként működik és ennek megfelelően – fénymikroszkóppal jól látható módon - munka-, ellen-, és referenciaelektrodból épül fel.

A szenzor felszínének külső rétegében kötött glükóz-oxidáz enzim az intersticiális folyadékban található glükóz enzimatis bontása révén H₂O₂-t képez, és elgondolásunk szerint az elektrodok felszínének belső rétegében található H₂O₂-ra specifikus méretkizárásos réteg biztosítja a szenzor H₂O₂-dal szembeni szelektivitását. A H₂O₂ elektrodfelületen végbemenő spontán bomlása amperometriás módszerrel detektálható áramjelet ad.

Kézenfekvő volt a feltételezés, hogy a klinikumban biztonsággal alkalmazható, glükóz mérésére kialakított mikroszenzor megfelelő átalakítás, a glükóz-oxidáz enzim inaktiválása után alkalmas lehet a lokális H₂O₂-koncentráció mérésére is.

Vizsgálataink során elsőként a glükóz-szenzor szelektivitását és szenzitivitását vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a szenzor H₂O₂ -, és glükózérzékenysége között jelentős, nagyságrendi különbség van, a szenzor H₂O₂-re megközelítőleg négyszázszor érzékenyebb, mint glükózra. A szenzor más elektroaktív molekulák – például aszkorbinsav – hozzáadásakor áramjelet nem adott, amely a méretkizárásos rétegnek köszönhető nagyfokú H₂O₂-szelektivitását támasztja alá.

A továbbiakban a diabetológiai gyakorlatban használt, amperometriás elven, mikroelektrodként működő elektroenzimatis glükóz-szenzort H₂O₂-szenzorrá alakítottuk át. Az enzim inaktivációját 5%-os SSA-oldattal végeztük el. Ezt követően a CGMS készüléket egy elektrokémiai mérőállomással helyettesítve vizsgáltuk az így létrehozott enziminaktivált H₂O₂-szenzor szelektivitását és szenzitivitását, az alsó méréshatárt. Összehasonlítottuk a

szenzor enzim-inaktiváció előtti és utáni H_2O_2 -érzékenységét. Emellett az újonnan létrehozott szenzor biológiai mintákban való alkalmazhatóságát is vizsgáltuk.

In vitro kísérleteink során a H_2O_2 -szenzorral PBS oldatban H_2O_2 -mérést végezve változó mennyiségű glükóz és több, fiziológias körülmények között előforduló elektroaktív vegyület hozzáadásakor áramjel nem volt detektálható. Mindezek alapján egyrészt bizonyítást nyert, hogy az enzim-inaktiváció teljes volt, másrészt, hogy a létrehozott H_2O_2 -szenzor H_2O_2 -vel szembeni szelektivitása kiváló. További amperometriás méréseink bizonyították, hogy a H_2O_2 -szenzor PBS pufferben a H_2O_2 -szint szenzitív, pontos és megbízható mérésére képes. A szenzor H_2O_2 -vel szembeni érzékenysége az enzim-inaktiváció során nem változott. Az amperometriás regisztrátumok jel-zaj aránya alapján végzett számításaink szerint a H_2O_2 -mérés alsó méréshatára $5\ \mu\text{mol/l}$ körüli.

Bár az irodalomban a H_2O_2 intersticiális szintjéről nem találtunk említést, a glükóz-szenzor szenzitivitási vizsgálatait és a szenzor H_2O_2 -ra vonatkoztatott érzékenységét és alsó méréshatárát is figyelembe véve feltételezhető, hogy az eredeti glükóz-szenzor glükózmérését az intersticiális folyadékban található H_2O_2 bizonyos szinten zavarhatja. A glükózmérés ebből származó bizonytalan mértékű pontatlansága talán a folyamatos külső kalibráció révén küszöbölhető ki.

Ezzel szemben kísérleteink is igazolták, hogy az általunk létrehozott H_2O_2 -szenzor H_2O_2 -mérését a jelenlévő glükóz – a teljes enzim-inaktiváció miatt - már nem zavarja.

A továbbiakban az általunk létrehozott H_2O_2 -szenzorral biológiai mintákban végeztünk vizsgálatokat. BSA-oldatban végzett méréseink során azonos mennyiségű H_2O_2 -oldat többszöri hozzáadásakor a korábbiaknál kisebb áramjel emelkedése, azaz kisebb H_2O_2 -érzékenységet tapasztaltunk. A háttérben nem a szenzor szenzitivitásának csökkenése, hanem a BSA-oldat antioxidáns kapacitása és nagyobb viszkozitása állhat. Humán plazmamintákban végzett amperometriás méréseink során pedig H_2O_2 hozzáadásakor meglepően gyorsan lecsengő „spike”-jellegű áramjeleket mértünk. Feltételezhető, hogy ez a plazma összetett, hatékony antioxidáns működésének következménye.

Az in vitro méréseket követően a szenzort altatott patkányokba implantáltuk intraperitoneálisan. Méréseink során értékelhető amperometriás áramjeleket detektáltunk, azonban az egészséges és diabéteszes állatokban mért áramjel között nem volt kimutatható szignifikáns különbség, és az áramjel fokozatos csökkenést mutatott.

A H_2O_2 -detektálás elvén működő elektroenzimatikus glükóz-szenzorok humán plazmamintában és a szubkután zsírszövetben tapasztalt szenzitivitás-csökkenése régóta ismert háttérének felderítése pedig vizsgálatok tárgyát képezi. Kerner és munkatársai

különböző kis molekulású anyagok elektród felületéhez történő reverzibilis adszorpciójának szerepét feltételezik, amely a glükóz és az oxigén felületi diffúzióját gátolja (76).

A CGMS készülék működéséhez folyamatos külső kalibrációt, ujjbegyi vércukorértékek időszakos bevitelét igényli, melynek hiányában a készülék működésképtelen. A mérések kapcsán a készülék kalkulál egy folyamatosan csökkenő, úgynevezett „slope” értéket, mely a szenzor szenzitivitásának felel meg, egyben megegyezik a kalibrációs konstanssal. Méréseink során megfigyeltük, hogy a glükóz-szenzor patkányba történő intraperitoneális implantációját követően a CGMS készülék ezen „slope” értéke a humán vizsgálatokhoz hasonló folyamatos csökkenést mutat. A glükóz-szenzorok ezen in vivo vizsgálatok során megfigyelhető lassú szenzitivitás-csökkenésének hátterében a szenzor felszínén végbemenő fibrin depozíció szerepe feltételezhető.

A szenzitivitás-csökkenés ellenére a glükózmérés megbízhatóságát az állandó külső kalibráció biztosítja (a készülék a külső kalibrációs érték segítségével kalkulálja a szenzitivitást jellemző kalibrációs konstans). Ugyanezen szenzitivitás-csökkenés bizonyára az általunk létrehozott H_2O_2 -szenzor esetén is fennáll, és az in vivo H_2O_2 -mérés eddigi sikertelenségét is részben magyarázhatja. A szenzitivitás csökkenésének kiküszöbölése - a szenzor szerkezetének esetleges módosításával - további vizsgálatok tárgyát képezheti.

Amperometriás méréseink eredményei alapján összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a klinikai használatban lévő CGMS szenzor az általunk alkalmazott enzim-inaktivációt követően biztonságosan alkalmazható a H_2O_2 -szint változásainak pontos, szelektív és szenzitív mérésére in vitro körülmények között. További vizsgálatokat és átalakításokat követően - reményeink szerint - az általunk létrehozott szenzor alkalmas lehet a H_2O_2 szint kis mértékű lokális változásainak in vivo mérésére is, mind állatkísérletekben, mind pedig humán vizsgálatokban.

5. A DOHÁNYZÁS ENDOTÉLDISZFUNKCIÓT OKOZÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA ENDOTÉLSEJTEKEN (II,III,VIII,IX,X,XI,XIII)

5.1. Bevezetés

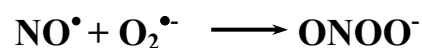
5.1.1. Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz enzim (eNOS) és a nitrogén-monoxid (NO)

A ROS gyűjtőfogalomhoz hasonlóan a szabadgyök és nem gyök természetű reaktív nitrogén származékok elnevezésére a reaktív nitrogén származék (RNS) elnevezés használható. A NO a RNS-ok között központi jelentőséggel bír. A NO olyan kis méretű molekula, amely egy párosítatlan spinű elektront tartalmaz, emiatt szabadgyöknek tekinthető. A NO szintézisét a nitrogén-monoxid szintáz enzimek (NOS) végzik, melyek L-argininből NO képződése mellett L-citrullint képeznek. A NOS enzimnek három izoformája ismert. Az endoteliális NOS (eNOS) a vaszkuláris endotélsejtek NO termeléséért felelős. A NO igen fontos jelátvivő molekula, mely számos fiziológiai folyamatban játszik kiemelt szerepet, úgymint a neurotranszmisszió, a vérnyomás szabályozása, a simaizom relaxáció és az immunreguláció (77). Az endotélsejtekben termelődő NO trombocita aggregáció-, leukocita adhézió-, és vaszkuláris simaizomsejt proliferáció gátló hatása révén központi szerepet játszik a vaszkuláris homeosztázis fenntartásában (78). Központi jelentősége miatt 1992-ben a Science Magazin az Év Molekulájává választotta (77).

A NO legfontosabb feladata az értónus szabályozása. A szolubilis-guanilát-cikláz enzim (sGC) Fe^{2+} -tartalmú Hem-csoportjához kötődve annak aktiválását végzi. A képződő ciklikus guanil-monofoszfát (cGMP) pedig ionsatornák és protein kinázok működésének befolyásolásán keresztül az érfali simaizomzat tónusának csökkentését és a thrombocyta adhézió gátlásáért felelős. A sGC enzimet az NO mellett a H_2O_2 is ativálhatja (77,79).

Vizes közegben a NO féléletideje mindössze néhány másodperc, alacsonyabb oxigéntartalmú közegben ennél valamivel hosszabb. Víz-, és zsírolékonysága egyaránt kiváló, ami lehetővé teszi a lipidmembránokon keresztüli diffúzióját. A RNS-ok túltermelődését nitrozatív stressznek nevezzük (77).

A sejtekben termelődő $\text{O}_2^{\bullet-}$ és a NO reakciója során egy további, rendkívül reakcióképes RNS, a peroxinitrit keletkezik:



Az endoteliális NO termelés többek között az eNOS enzim posttranszlációs modifikációjától függ., melyet számos egyéb faktor mellett az enzim eltérő helyein történő reciprok foszforilációs-defoszforilációs folyamatok szabályoznak. Az eNOS aktivitásának Ser (1177)-, és Thr (495) oldalláncokon történő foszforilációs szabályozása egy bonyolult, reciprok foszforilációs folyamat, melyben több protein kináz (PK) és proteinfoszfátáz vesz részt. A Ser (1177) oldallánc PKB-mediált foszforilációja növeli, a Thr (495) oldallánc PKC-mediált foszforilációja pedig csökkenti az eNOS aktivitását, így az endoteliális NO termelést (80, 86).

5.1.2. Dohányzás okozta oxidatív stressz és endotél-diszfunkció

A dohányzás endotél-diszfunkciót okozó hatása régóta ismert. A dohányfüst egyrészt nagy mennyiségű szabad gyök, prooxidáns és aldehid tartalma révén okoz endotélsejt károsodást (81). Ismert, hogy a NADPH-oxidáz, xantin-oxidáz, monomer eNOS és a mitokondriális elektron transzport lánc ROS termelésének fokozása révén – szuperoxid, hidrogén-peroxid, hidroxil-szabadgyök és peroxinitrit képzés – az endogén ROS termelést is befolyásolja és ezáltal az endotélsejtek oxidatív károsodását okozza (82,83). Emellett PKC aktivációt okoz, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) indukálta endotélsejt migráció és érképződés folyamatát károsítja (82), illetve DNS károsító és apoptosist indukáló hatása is ismert (84). Mindezen hatások eredményeként endotél diszfunkció, és az endotél dependens vazodilatáció károsodása alakul ki, melynek hátterében a csökkent NO termelés és biológiai hozzáférhetőség áll (85). Az endoteliális NO termelés egyrészt az eNOS transzkripció és poszt-transzlációs modifikációjától függ, másrészt befolyásolja az NO ROS-ok általi inaktivációja, melynek mértéke a szervezet antioxidáns kapacitásának függvénye (86).

Az eNOS aktivitásának szabályozása egy rendkívül összetett, számos PK és proteinfoszfátáz működését involváló folyamat. A Ser(1177) oldallánc foszforilációjában - és ezáltal az eNOS aktivációjában – a PKB (Akt) játszik központi szerepet (86,87). Ugyanakkor azonban a véráramlás okozta nyíróerő (87), VEGF (82), inzulin (88), H₂O₂ (89), a vörösbőrben található polifenolok, vagy a bradikinin (90) más protein kinázok – mint a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) dependens protein kináz (PKA) – mediálta foszforilációt eredményez a Ser(1177) aktivációs helyen. Kimutatták, hogy ezzel egyidőben a PKA a proteinfoszfátáz 1 aktivációja révén a Thr(495) oldallánc defoszforilációját végzi, mely elősegíti az enzim aktivált állapotban tartását (86).

A Thr(495) oldallánc foszforilációja – melyet a protein kináz C (PKC) aktivál – az eNOS aktivitásának csökkenését eredményezi, így az enzim működését gátló szabályozó helyként ismert. Az eNOS inaktivációjában a PKC játszik központi szerepet, mely a Thr(495) foszforilációja mellett a Ser(1177) defoszforilációját segíti elő (86).

Munkacsoportunk korábban sertés aorta endotélsejteken végzett kísérletekkel igazolta, hogy akut cigarettafüst hatás az agonista indukálta kalcium szignál és cGMP termelés dóziszfüggő csökkenését eredményezi (91), mely hatást az antioxidáns hatású redukált glutation (GSH) képes kivédeni (92).

Ma már egyértelműen bizonyított, hogy a cigarettafüst az L-arginin-eNOS-NO-cGMP útvonal integritását eltérő szinteken befolyásolva okoz endotéldiszfunkciót. Az eNOS enzim cigarettafüst indukálta poszt-transzlációs módosulásai, mely az enzim különböző helyeken történő foszforilációját érinti ezidáig nem képezték vizsgálat tárgyát.

5.1.3. A redukált glutation (GSH)

Az intracelluláris redox homeosztázis fenntartásában több ismert redox rendszer kap szerepet. Közülük a glutation rendszer (GSH/GSSG) központi szerepe jól ismert. A glutation rendszer a legfontosabb celluláris redox puffer, ezáltal a sejt redox állapotának reprezentatív indikátora (93). A GSH az eukarióta sejtekben legnagyobb mennyiségben jelen lévő szabad tiol, mely optimális intracelluláris redox környezetet biztosít a makromolekulák megfelelő működéséhez (93). A redukált GSH a biológiailag aktív forma, mely oxidatív stressz hatására glutation diszulfidá (GSSG) oxidálódik. A sejten belül fiziológias körülmények között a glutation több mint 90%-a redukált formában van jelen. A redukált forma oxidált formához viszonyított aránya az oxidatív stressz kiváló markere. A sejtek többféle mechanizmus – a GSSG enzimatisz redukciója, a citoszol de novo GSH szintézise, exogén GSH felvétel – révén a glutationt nagy arányban redukált formában tartják (93).

A GSH számos intracelluláris redox folyamatban vesz részt, melyek célzott kontrollját szigorú kompartmentalizáció segíti. Ennek megfelelően a sejten belül citoszolikus, mitokondriális, nukleáris, és az endoplazmatikus retikulumban található GSH készlet lelhető fel. Ez biztosítja az intracelluláris redox státusz állandóságát és véd a különböző ROS-ok DNS károsító, a képződő proteinek szerkezeti károsodását-, illetve makromolekuláris diszfunkciót okozó hatásától. Antioxidáns kapacitása több tényező együttes hatásából adódik: több antioxidáns enzim kofaktora (glutation peroxidáz), a hidroxil-gyök direkt semlegesítését végzi, részt vesz a legfontosabb antioxidánsok (C-vitamin, E-vitamin) regenerációjában (77). A

nukleáris GSH a DNS expressziójában és a repair mechnizmusokban fontos szerepet játszó proteinek szulfhidril csoportjai számára megfelelő redox homeosztázist és ezáltal stabilitást biztosít (77).

A GSH/GSSG rendszer egyéb redox proteinekkal együttműködve szabályozza az intracelluláris redox homeosztázist. A thioredoxinok a protein diszulfid kötések reverzibilis redukcióját katalizálják és a glutation rendszerrel együttműködve fontos szerepet töltenek be a sejten belüli redox folyamatok szabályozásában (93).

A NADPH az oxidált glutation és a thioredoxinok redukciójában kulcsfontosságú szerepet tölt be. A NADPH keletkezésében a pentóz-foszfát shunt glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimjének (G6PDH) van kiemelt jelentősége, mely enzim aktivitása oxidatív stressz, ROS-ok hatására nő, így a G6PDH enzimnek fontos szerepe van a NADPH mediálta antioxidáns védelemben (93).

5.2. Célkitűzések

Ismert tény, hogy a cigarettafüst endotél diszfunkciót okoz az L-arginin-eNOS-NO-cGMP jelátviteli útvonal befolyásolása útján, a pontos mechanizmus azonban ezidáig tisztázatlan volt. Kísérleteink célja a cigarettafüst akut hatásának in vitro vizsgálata volt endotélsejteken.

Kérdéseink a következők voltak:

- a cigarettafüstnek az eNOS enzim aktiváló foszforilációjára kifejtett hatása
- a cigarettafüstnek az eNOS enzim gátló foszforilációjára kifejtett hatása
- az antioxidáns hatású GSH-nak az eNOS enzim foszforilációs szabályozására kifejtett hatása

5.3. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez egér endotelioma sejteket használtunk (LGC Promochem). A dohányfüst idő-, és koncentrációfüggő akut hatásának vizsgálatához a sejteket 37 C-on, 5% CO₂ mellett, Krebs-pufferrel (kontroll) vagy dohányfüstpufferrel (DFP) inkubáltuk többféle koncentrációban (5-50%) és időintervallumokban (5-30 perc). A DFP-t filteres cigaretta füstjének (Camel; R.J. Reynolds Tobacco; < 10mg kátrány) egy vákumcsőszivattyú segítségével Krebs-pufferbe történő szívásával állítottuk elő (17. ábra)

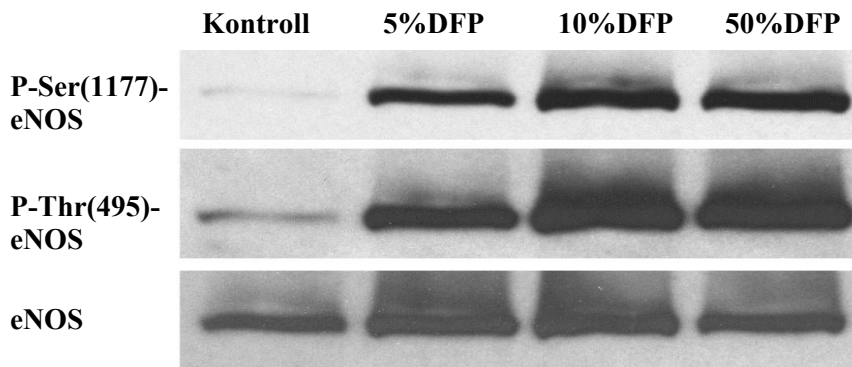


17. ábra: A DFP előállítására alkalmas készülék. A DFP-t filteres cigaretta füstjének egy vákumcsőszivattyú segítségével Krebs-pufferbe történő szívásával állítja elő.

További kísérleteink során antioxidáns előkezelést alkalmaztunk GSH-val (5mM, 15 perc Krebs pufferben). A tenyésztett endotélsejteket a DFP-vel való kezelést követően lizáltuk, a lizátumokat lecentrifugáltuk (13 000 rpm, 10 min, 4C), majd a 80-120 ug fehérjét tartalmazó mintákat sodium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS PAGE) futtattuk. Ezt követően a futtatott mintákat Western blot technikával transzferáltuk, majd blokkoltuk. Az elsődleges anti-eNOS, anti-P-Ser (1177)-eNOS (Cell Signaling) és anti-P-Thr(495)-eNOS (BD Pharmingen) antitestekkel 1:1000 hígításban egy órán át inkubáltuk a membránokat. Mosást követően nyúl elleni másodlagos poliklonális antitestet (Cell Signaling) használtunk 1:2000 hígításban a bekötődött anti-P-Ser(1177)-eNOS antitestek kimutatására. Az anti-P-Thr(495)-eNOS és anti-eNOS antitestek detektálására IgG1 egér ellenes poliklonális antitestet alkalmaztunk (Zymed Laboratories). A detektált fehérje mennyiségét minden esetben az eNOS fehérjére korrigáltuk és a kontrollhoz viszonyítottuk. Eredményeinket átlag+-SEM-ként adtuk meg. A statisztikai analízist az SPSS 13.0 verzióval végeztük, szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

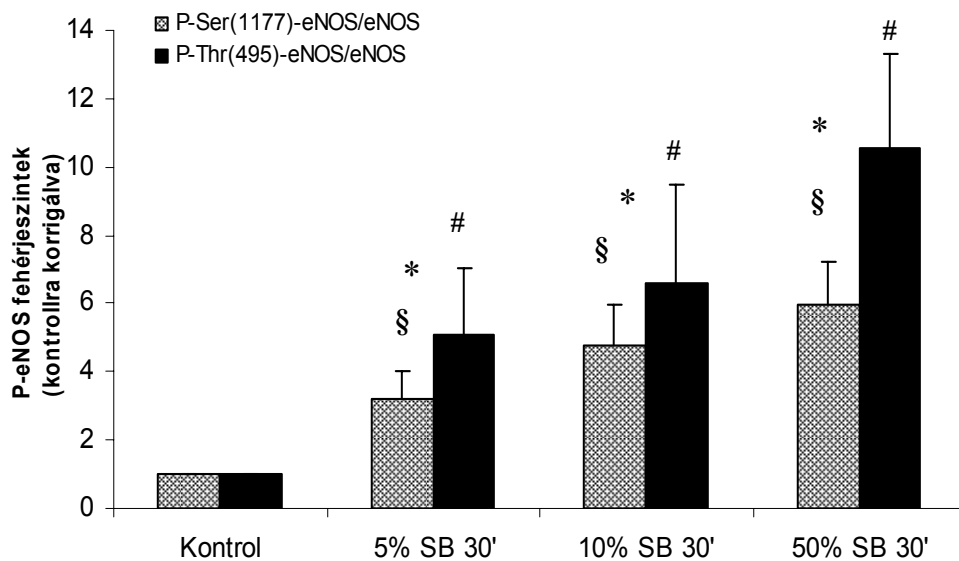
5.4. Eredmények

A DFP koncentráció-, és időfüggően növelte az eNOS enzim foszforilációját mind a Ser(1177) mind a Thr(495) oldalláncokon (18. és 20. ábra). A legerősebb foszforilációs válasz 50%-os dohányfüst pufferrel 20 percig történő kezelés hatására jelentkezett. A Thr(495) oldallánc foszforilációja minden esetben szignifikánsan nagyobb volt a Ser(1177) oldallánc foszforilációjánál (19. és 21. ábra). A DFP-vel nem kezelt kontroll endotélsejt mintákban a bazális P-Thr(495) szint és a bazális P-Ser(1177) szint közötti eltérés a fehérjeexpresszió kontrollra való korrigálásával kiküszöbölhető volt.

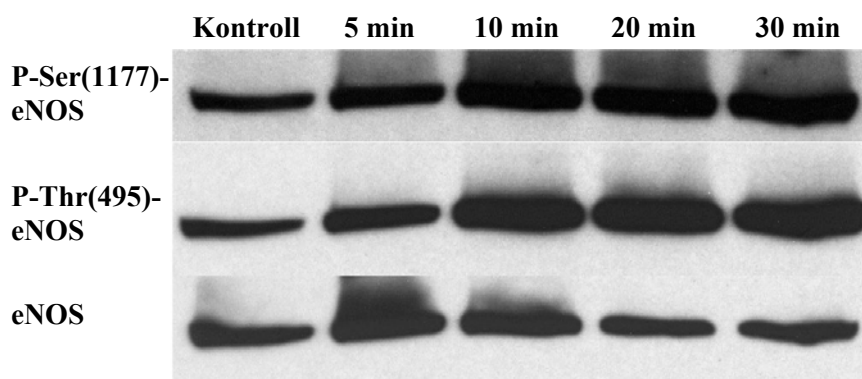


18. ábra: Az eNOS aktiváló és gátló foszforilációjának vizsgálata endotélsejteken eltérő koncentrációjú DFP-oldattal 30 percig történő inkubációt követően.

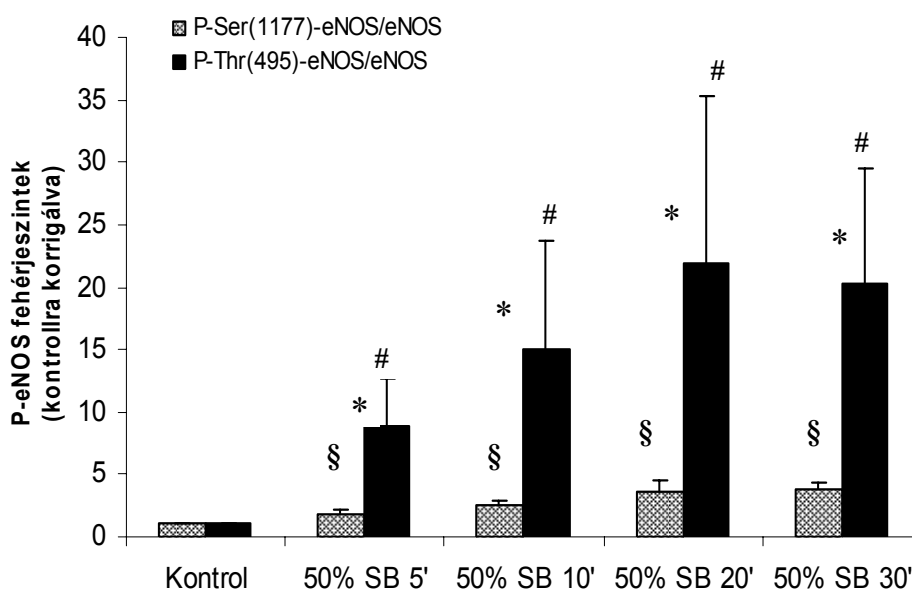
Az ábrán egy reprezentatív Western blot eredménye látható.



19. ábra: Az eNOS foszforilációjának DFP okozta változásai §, # vs. kontroll; * P-Ser(1177)-eNOS vs P-Thr(495)-eNOS. n=5

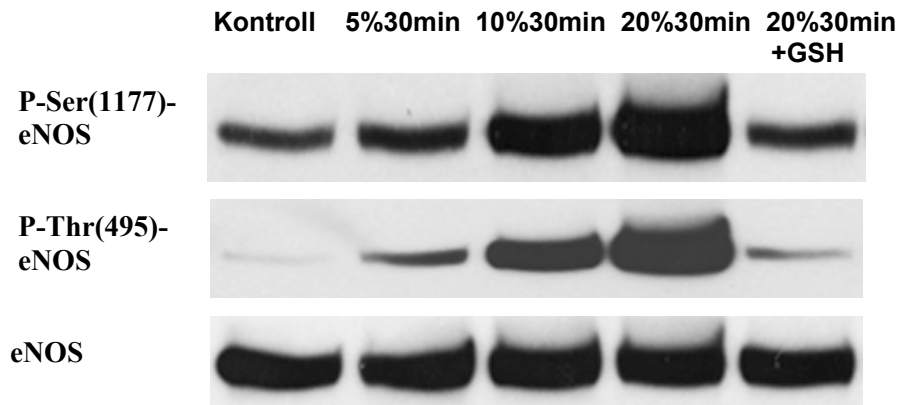


20. ábra: Az eNOS aktiváló és gátló foszforilációjának vizsgálata endotélsejteken 50%-os DFP-oldattal különböző ideig történő inkubációt követően. Az ábrán egy reprezentatív Western blot eredménye látható.



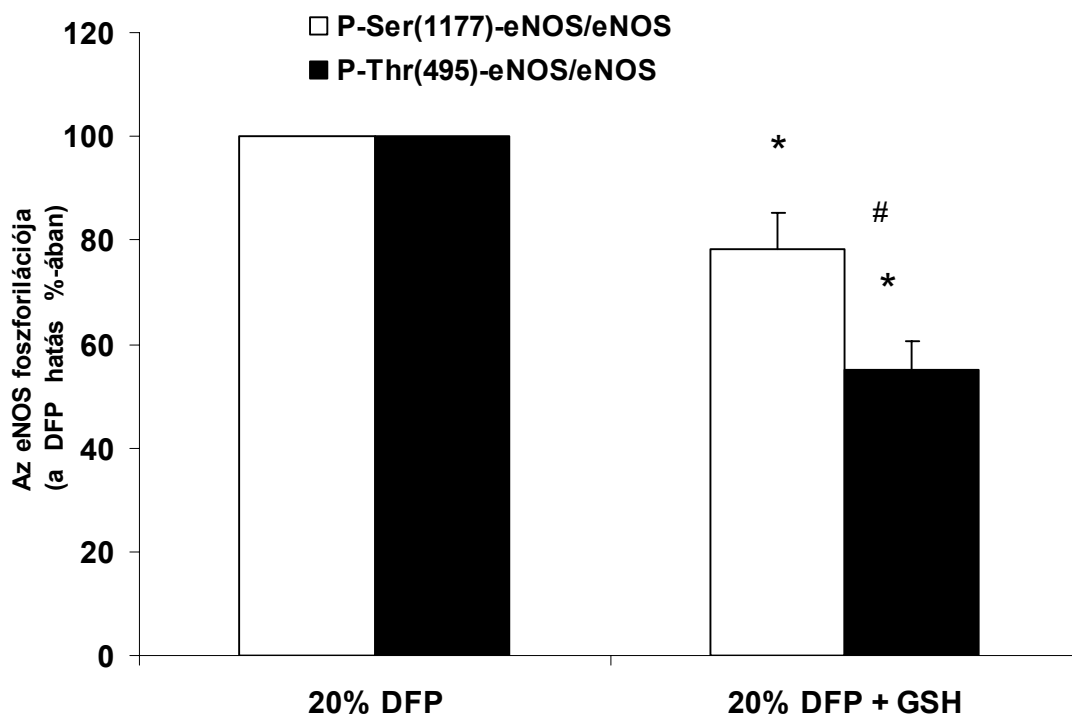
21. ábra: Az eNOS foszforilációjának DFP okozta változásai
 §, # vs. kontroll; * P-Ser(1177)-eNOS vs P-Thr(495)-eNOS. n=5

Az endotélsejtek GSH-val történő előzetes inkubációját követően az eNOS aktiváló foszforilációja a Ser(1177) oldalláncon 20%-kal csökkent, míg egyidejűleg a gátló foszforiláció a Thr(495) oldalláncon 45%-os csökkenést mutatott (23. ábra).



22. ábra: A GSH előkezelés hatásának vizsgálata az eNOS aktiváló és gátló foszforilációjára 20%-os DFP-vel 30 percig történő kezelés mellett.

Az ábrán egy reprezentatív Western blot eredménye látható.



23. ábra: A GSH véd a DFP hatással szemben. Az ábrán az eNOS aktiváló és gátló foszforilációjának a GSH védő hatására bekövetkező változását ábrázoltuk a DFP hatás százalékában kifejezve, átlag \pm SEM; * vs. 20% DFP oldat 30 min, # P-Ser(1177)-eNOS vs. P-Thr(495)-eNOS. Az adatokat a kontrollra és az össz-eNOS fehérjeszintekre korrigáltuk.
n=5.

5.5. Megbeszélés

Az endotéliszfunkció számos kardiovaszkuláris betegség – hipertónia, atheroszklerózis, diabétesz mellitusz, krónikus vesebetegség – indikátora (94,95). Az endotélisejtek megváltozott működésének következménye a NO termelésének és biológiai hozzáférhetőségének csökkenése, ami az endotélfüggő vazodilatáció károsodásához vezet (82). A dohányfüst endotéliszfunkciót okozó hatása régóta ismert. A dohányfüst több mint 4700 kémiai összetevőt tartalmaz (81). A dohányzás összetett hatása révén mind a makro-, mind a mikrovaskuláris endotél károsítja (85). A dohányfüst endotéliszfunkciót okozó hatásában az eNOS enzim működésének befolyásolása és ezáltal az NO biológiai hozzáférhetőségének megváltozása központi szerepet játszik, melynek pontos patomechanizmusa ezidáig ismeretlen volt. Endotélisejteket dohányfüst extraktummal 24 órán keresztül inkubálva csökken az eNOS messenger-RNS (mRNS) szintje és az eNOS expressziója (96). Barua és munkatársai dohányzó személyektől származó szérummal endotélisejteket inkubáltak 12 órán keresztül, ami megnövekedett eNOS fehérje expresszió mellett csökkent eNOS aktivitáshoz és NO termeléshez vezetett (97).

Kísérleteink során a dohányzásnak az eNOS enzim poszttranszlációs szabályozására kifejtett hatásait vizsgáltuk egér endotélisejteken. Az eNOS enzim aktiváló és gátló oldalláncon történő foszforilációját vizsgáltuk rövid, maximum 30 perces DFP-vel történő kezelést követően. Elsőként sikerült igazolnunk, hogy a rövid ideig történő DFP kezelés koncentráció-, és időfüggő módon növeli az eNOS enzimnek mind az aktiváló, mind a gátló oldalláncon történő foszforilációját. A minták össz-eNOS fehérje szintje változatlan maradt. A gátló Thr(495) oldallánc foszforilációja azonban fokozottab volt az aktiváló Ser(1177) oldalláncénál. Mindezek alapján feltételezhető, hogy DFP hatására az aktiváló/gátló foszforiláció arányának gátló irányba történő eltolódása vezet az eNOS aktivitásának és következményesen a NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenéséhez.

Korábbi kísérleteink igazolták a dohányfüst vízdoldékony komponenseinek az eNOS-NO-cGMP útvonalra kifejtett gátló hatását, mely hatás SOD-dal, katalázzal és deferoxaminnal nem volt kivédhető. Ez alapján a szuperoxid, hidroxil-gyök és a lipid peroxidáció ezen folyamatban betöltött szerepe kizárható volt (91,92).

Ismert, hogy a dohányfüst kátránytartalma mellett számos káros hatású prooxidáns, szabadgyököt és aldehideket tartalmaz, melyek erélyes oxidatív hatást fejtenek ki (81). A GSH/GSSG a legfontosabb celluláris redox puffer rendszer, ezáltal a sejt redox állapotának reprezentatív indikátora (93). A GSH az eukarióta sejtekben legnagyobb mennyiségben jelen

lévő szabad tiol, mely optimális intracelluláris redox környezetet biztosít a makromolekulák megfelelő működéséhez (93). Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai igazolták, hogy az aspecifikus szabadgyök és aldehid-fogó GSH neutralizáló hatásának köszönhetően véd a formaldehid károsító hatásától, mely a DFP-ben nagy mennyiségben megtalálható (91). Feltételezhető, hogy a dohányfüstben található aldehid komponensek felelősek a dohányfüstnek az eNOS foszforilációs szabályozására kifejtett hatásáért az eNOS működésében kulcsszerepet játszó tiol-csoportok módosításán keresztül. Zhang és munkatársai kimutatták, hogy egy ditiol oxidáló vegyület a dohányfüsthez hasonló hatást fejt ki az eNOS aktivitására. Ugyanakkor mind a GSH, mind a captopril – szulfhidril-csoportjaiknak köszönhetően - mérsékelni képes az endotélfüggő vazodilatáció dohányfüst kiváltotta károsodását (98).

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a GSH szignifikánsan csökkentette az eNOS DFP indukálta foszforilációját mind a Ser(1177)-, mind a Thr(495)-oldalláncokon. A gátló foszforiláció aktiváló foszforilációhoz viszonyított csökkenése szignifikánsan nagyobb mértékű volt. Az eNOS foszforilációs szabályozásának GSH hatására aktiváló irányba történő eltolódása az eNOS fokozott aktivitásához és a NO biológiai hozzáférhetőségének és ezáltal az endotélfunkciónak a javulásához vezet. A GSH endotéldiszfunkcióra kifejtett jótékony hatását tehát részben az eNOS enzim poszttranszlációs-foszforilációs szabályozásának befolyásolásán keresztül fejt ki. A GSH feltehetően a dohányfüstben található aldehidek megkötése (91), és ezáltal a teljes poszttranszlációs szabályozási folyamat arányainak eltolása révén fejt ki pozitív hatását az eNOS működésére.

Eredményeink igazolták, hogy a dohányfüst az eNOS foszforilációs szabályozásának komplex befolyásolásán keresztül már rövid távon csökkenteni képes a NO biológiai hozzáférhetőségét és az endotélfüggő vazodilatációt, ami igen jelentős kockázati tényező a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában és progressziójában egyaránt (94,95). A GSH védő szerepének igazolása a dohányfüstben található aldehidek endotéldiszfunkció-kiváltásában betöltött patogenetikai szerepét támasztja alá. A gátló hatású Thr(495)-oldallánc foszforilációjáért leginkább felelős PKC β jelátviteli útvonalának gátlása ígéretes lehetőségnek tűnik a dohányzás káros hatásainak kivédésében (99). A PKC ubiquiter volta miatt azonban ezen inhibitorok klinikai gyakorlatban való alkalmazhatósága kérdéses és további kutatások tárgyát kell hogy képezze.

6. VÉGTAGI GANGRÉNÁT OKOZÓ KALCIFILAXIS HASNYÁLMIRIGY-VESE TRANSZPLANTÁCIÓN ÁTESETT BETEGÜNKNÉL; A FETUIN LEHETSÉGES SZEREPE (IV,XII)

6.1 A kalcifilaxis

A kalcifilaxis a metasztatikus kalcifikáció egy sajátos formája, amely elsősorban a bőrt és a szubkutiszt érinti és rossz gyógyhajlamú fekélyek és gangrénák kialakulásához vezet. Diagnosztikus kritériumai hisztológiai eltérések: a kis és középnagy artériák tunika médiáját érintő kalcifikáció, az intima proliferációja, endovaszkuláris fibrózis és intravaszkuláris trombozisz. Végeredményben obliteratív vaszkulopátia alakul ki, mely az érintett szövetek iszkémiájához és nekrozisához vezet. A vaszkulopátia kialakulását az érintett bőrterület igen intenzív hiperesztéziája és analgetikumokra sem reagáló kifejezett fájdalma követi, majd hiperémia, livedo retikulárisz, indurált plakkok és tapintható szubkután csomók jelennek meg. A folyamat késői szövödményei a rossz gyógyhajlamú fekélyek és gangrénák (100,101). Ezek gyakori felülfertőződése előbb vagy utóbb szepszisbe torkollik és egy éven belül a betegek nagy részének halálát okozza. A másik leggyakoribb halálok a viscerális szervek iszkémiás károsodása (102). A kórképet - mint szisztémás hiperszenzitivitási reakciót - elsőként Selye írta le az 1960-as években (103).

Etiológiája máig sem pontosan tisztázott, leggyakrabban urémiás és/vagy hyperparatireózisos betegeknél fordul elő (100), a dialízis kezelés első évében, ezen belül is a diabéteszes, obez, europid populációhoz tartozó nőkben írták le legtöbbször (102,104). Gyakorisága az utóbbi időben növekvő tendenciát mutat, irodalmi adatok szerint az urémiás betegek körülbelül 4%-át érinti. Progresszív kórkép, amely egy éven belül az esetek 60-100%-ában a betegek halálát okozza (102). Az irodalom egyre gyakrabban tesz említést nem urémiás betegeknél kialakuló kalcifilaxissal, melynek elnevezése non-urémiás kalcifilaxis (NUC) (105). A kórkép hátterében leggyakrabban primer hiperparatireózis, autoimmun kórképek, alkoholos májbetegség, malignus daganatok állnak. Emellett a kemoterápiás kezelés, protein C vagy protein S hiány, Crohn betegség, jelentős súlyvesztés is kalcifilaxis kialakulásához vezethet. Az esetek jelentős részében a kortikoszteroid kezelés és a diabétesz, mint predisponáló faktor szerepe feltételezhető (105,106).

A betegség patogenezisében központi szerepet játszik a kalcifikáció inhibitorainak csökkent szintje. Az alpha-2 Heremans Schmid glikoprotein (Ahsg/ fetuin-A) elnevezésű protein a szervezetben az ektópiás kalcifikáció inhibitora, alacsony szintje kalcifikációt

eredményez és az erek mediájának meszesedését okozhatja (107). Másrészt a hipofetuinémia inzulin hiperszenzitivitáshoz vezet, amely egyéb hatásai mellett az intimális proliferációért lehet felelős (108).

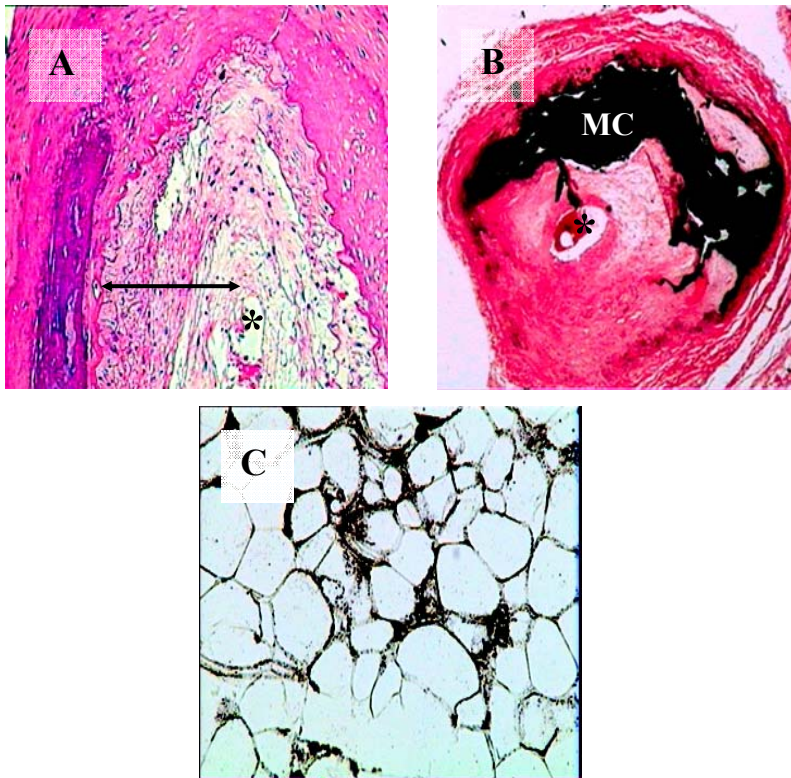
6.2. Esetismertetés

Az 50 éves nőbetegnek öt éves kora óta ismert volt 1-es típusú diabétesz mellitusza, hét éve hypertóniája. A betegnél a perifériás vaszkuláris betegséget kivéve szinte valamennyi diabétesz mellituszra jellemző mikro-, és makrovaszkuláris szövődmény jelentkezett. Urémia miatt dializálni kellett és transzplantációs várólistára helyeztük. A transzplantáció előtt mindkét oldali artéria dorzálisz pédisz és tibiálisz poszterior tapintható volt, klaudikáció intermittensz nem jelentkezett, és a betegnek végtagi ulkusa, gangrénája nem volt.

A beteg 2000. novemberében hasnyálmirigy-vese transzplantáción esett át, ezt követően inzulinkezelésre és dialízisre sem szorult. Három hónappal a transzplantáció után a bal kéz IV-V. ujján száraz gangréna alakult ki. Öt hónappal ezután a bal halluxon jelent meg gangréna. 2002. februárjában fájdalmas multiplex felső és alsó végtagi gangrénák mellett a bal láb I. ujján oszteomielitist diagnosztizáltunk.

A vaszkulitiszes eredet kizárására elvégzett immunkémiai vizsgálat negatív eredménnyel zárult. A szérum kalcium, foszfát, parathormon, összfehérje és albumin szint normál tartományban volt, a szekunder hiperparatireózis kizárható volt. Betegünknel orális glükóz terhelés során mértük a plazma glükóz és inzulin szintjét (éhom, 30, 60, és 120 perc múlva). Ennek eredménye az említett időpontokban: glükóz: 5.1, 5.2, 5.2, 5.2 mmol/l és az inzulin ugyanezen időpontokban: 60, 96, 126, 198 pmol/l. A kapott értékek segítségével meghatároztuk az első és a második fázisú inzulinszekréción mértékét. Az első fázis szekréciónja 963 pmol, míg a második fázisú szekréción 247 pmol volt. Emellett meghatároztuk az inzulin szenzitivitást a homeostasis model assessment (HOMA index) és az inzulin szenzitivitási indexek (ISI) segítségével. A HOMA index értéke 2,26 volt, míg a Stummvoll szerint meghatározott ISI értéke 0,14 volt, ami nagyfokú inzulin-érzékenységet jelzett.

Oszteomielitisz miatt a bal oldali hallux amputációjára került sor. Az amputátum szövettani feldolgozása során Kossa reakcióval az artériák mediájának meszesedését, valamint zsírszöveti kalcifikációt láttunk, emellett hematoxilin-eozin festéssel súlyos fokú intimális proliferáció volt kimutatható; ezek a kalcifilaxis diagnosztikus kritériumai (24. ábra, A, B és C panel).



24. ábra: A szövettani vizsgálat eredménye (Dr. Degrell Péter anyagából)

*A panel: Arteria intima proliferáció lumenszűkülettel (↔ = intima, * = érlumen, hematoxin-eosin festés, 400x-os nagyítás)*

*B panel: Arteria media kalcifikáció (MC=media kalcifikáció, * = az érlumenben trombus látható, Kossa reakció, 100x-os nagyítás)*

C panel: Zsírszöveti kalcifikáció (Kossa reakció, 200x-os nagyítás)

Csontszcintigráfias és többszöri röntgen vizsgálat lágyrész meszesedést nem mutatott. 2002. májusában multiplex progrediáló gangrénák miatt bal oldali crurális amputációra került sor. A beteg ezt követően fájdalmas felső és alsó végtagi gangrénák miatt több alkalommal pentoxifylline (Trental), pentosan polysulfate (SP54) és thioctánsav (Thiogamma) infúzióban részesült. Az alkalmazott szteroid dózist megemeltük, hogy a fokozott inzulin-érzékenységet csökkentsük (methylprednisolone napi 24 mg).

Meghatároztuk a szérum fetuinszintet, amely 51 egészséges önkénteshez viszonyítva alacsonyabb értéket mutatott. (408 vs. $593 \pm 93 \mu\text{g/ml}$, mean \pm 2SD, $p < 0,05$). A betegnek 2003. decemberére összes ulkusa és gangrénája begyógyult vagy lelökődött.

6.3. Megbeszélés

A bőrcanceráció és gangréna kialakulásának hátterében számos kórkép állhat. Felmerülhet előrehaladott okkluzív perifériás arteriás betegség, diabéteszes neuropátia, előrehaladott krónikus vénás elégtelenség, perifériás embólia, krioglobulinémia, kriofibrinogénémia, oxalózis, nekrotizáló vaszkulitisz, ulceráló bőrtumor, infekciózus ulceráció, angiodiszplázia miatti fekély, de okozhatja pioderma gangrenózum, koleszterin embolizáció, kumarin nekrozis, antifoszfolipid szindróma, nekrobiózis lipoidika, hematológiai és autoimmun kórképek, ciklosporin okozta arteriopátia és amiloidózis is (109). A gangréna hátterében kalcifilaxis is állhat.

A kórképet dialízis kezelés alatt álló urémiás és vesetranszplantált betegekben írták le leggyakrabban. Irodalmi adatok szerint ezidáig összesen 22 esetben írták le vesetranszplantáción átesett betegeknél (110). Valamennyi beteg kortikoszteroid terápiában részesült és több esetben a rejekció miatt adott nagy dózisu szteroid lökésterápiát követően rövid időn belül alakult ki a kórkép. Egyes korábbi megfigyelések szerint a kortikoszteroidoknak – az inzulin hiperszenzitivitás és a következményes intimalis proliferáció mérséklése révén - előnyös hatásai vannak kalcifilaxisos betegeknél (112). Mi is azt tapasztaltuk, hogy az immunszuppresszánsként adott metilprednizolon dózisának emelése kedvezően hatott a beteg gangrénáira.

Mazzaferro vizsgálata kimutatta, hogy a vesetranszplantáció ugyan kedvezően befolyásolja, de nem állítja meg a koronária erek dialízis kezelés alatt elkezdődő kalcifikációjának progresszióját, ami a kalcifilaxissal kapcsolatban is feltehetően elmondható (111).

A fetuin-A, vagy alfa-2-Heremans Schmid glikoprotein egy 60 kDa nagyságú, a szérumban keringő glikoprotein, amely a májban termelődik és az extracelluláris tér ubikviter alkotórésze (113,114). Az extraszkeletális calcifikáció, a kalcium-foszfát precipitáció hatásos inhibitora. Negatív akut fázis fehérje, gyulladáso folyamatok down-regulálják a szintézisét, szérumszintje negatív korrelációt mutat a C-reaktív protein és a gyulladáso citokinek - IL-6, IL-1, TNF-alfa – szintjével krónikus vesebetegekben és hemodializált betegekben (113,114). Fetuin-A knock out egerekben inzulin hiperszenzitivitás észlelhető, valamint kiterjedt ektópiás calcifikáció alakul ki a miokardiumban, a vesében, tüdőben és a bőrben (115).

Betegünknel az orális glükóz terhelés során a normálisnál alacsonyabb első és második fázisu inzulinszekréció és ennek ellenére a teszt során nem emelkedő vércukorszint felvetette az inzulin hiperszenzitivitás lehetőségét. Elvégeztük az inzulin szenzitivitási index

Stumvoll szerinti meghatározását is (116), melynek magas értéke fokozott inzulin érzékenységet igazolt. Ismert, hogy az inzulin hiperszenzitivitás intimális proliferációhoz vezethet. Ezek alapján betegünk esetében a hipofetuinaemia és a következményes inzulin hiperszenzitivitás mind a media kalcifikáció, mind pedig az intimális proliferáció mechanizmusát magyarázhatja. Ugyanakkor az inzulin hiperszenzitivitás vazodilatációt is okozhat, ami a szisztémás vérnyomás csökkentése által a perifériás iszkémiát súlyosbíthatja és így betegünkénél is hozzájárulhatott a gangrénák súlyosbodásához.

A kalcifilaxis diagnózisának felállítása nehéz, általában túl későn kerül rá sor és ez jelentősen hozzájárul a betegek mortalitásához. A diagnózis felállításának legbiztosabb módja a bőrbioopszia. Elvégzése azonban kockázatos és relatíve kontraindikált (112), ugyanis az iszkémiás nekrozis továbbterjedését okozhatja. Betegünkénél oszteomielitisz miatt a lábujjat mindenképpen amputálni kellett, és így lehetőségünk volt hisztológiai vizsgálatra, amely megerősítette a kalcifilaxis diagnózisát. A szövettani vizsgálat egyértelműen kizárta a diabéteszes angiopátia lehetőségét. A transzplantációt követő ciklosporin kezelés felvetette a ciklosporin okozta arteriopátia lehetőségét is, amelyet a szövettani vizsgálat szintén kizárt, csakúgy mint az amyloidosist.

Az utóbbi időben egyre több közlemény foglalkozik a nem urémiás kalcifilaxissal (NUC), melynek gyakorisága növekszik. Ezen esetek döntő többségében a szérumban a kalcium, foszfor és parathormon szint normál tartományban van. Betegünk esetében is normál vesefunkció, normál szérumban a kalcium és foszfát szint és normál mellékpajzsmirigy hormon szint mellett jelentek meg a kalcifilaxisra jellegzetes bőrelváltozások. NUC esetén a bőrelváltozások leggyakrabban az alsó végtagok disztális részét érintik, makroszkópos megjelenésükben az urémiás betegeknél tapasztalt léziókhöz hasonlóak. NUC esetén a mortalitási arány 52% és a leggyakoribb halálok ebben az esetben is a szepszis. A kórkép pontos patogenezise máig ismeretlen és hatékony specifikus terápia nincs a birtokunkban (105,106).

A kalcifilaxis standard terápia magában foglalja az intenzív lokális sebkezelést, a másodlagos infekciók antibiotikus terápiaját, a kalcium és foszfátszint kontrollját, igen magas parathormonszint mellett a mellékpajzsmirigy eltávolítást, a hiperbárikus oxigén terápiaát és az allogén bőrátültetést. Emellett a biszfoszfonátok, a kalcimimetikumok (cinacalcet) és a nátrium-tioszulfát hatékonysága is bizonyított (117).

A kalcifilaxisban szenvedő betegek életkilátásai rosszak. Betegünkénél a rendszeres kombinált keringésjavító infúziós kezelések mellett jelentősen javítható volt a perifériás

véráramlás, az ulkuszok visszafejlődtek, ezért az általunk alkalmazott kezelés javasolható kalcifilaxisban szenvedő betegeknél.

Irodalmi adatok szerint diabéteszes betegeknél veseelégtelenség miatt elvégzett sikeres hasnyálmirigy-vese transzplantáció után a perifériás vaszkuláris betegség is érdekes módon nemhogy javulást, hanem inkább progressziót mutat (15). A jelenség oka szintén ismeretlen. A sikeres hasnyálmirigy-vese transzplantáció tehát csak látszólagos remissziót hoz, az érrendszer korábban elkezdődött károsodása irreverzibilis és progresszív marad. A legfontosabb feladatunk ezért a vaszkuláris károsodások progressziójának lassítása a diabétesz, a veseelégtelenség és a hiperparatireózis korrekt terápiájával.

Betegünk kórtörténetét azért tartjuk bemutatásra érdemesnek, mert hasnyálmirigy-vese transzplantáció után, a diabétesz és az urémia klinikai remissziójának fázisában kialakult kalcifilaxis megjelenésére az irodalomban nem találtunk említést.

7. TÉZISEK

1/1 A CGMS a hagyományos négyponos ujjbegyi vércukormérésnél lényegesen pontosabban jelzi a vércukorszint ingadozásait és kifejezetten alkalmas a tünetmentes hipoglikémiák kimutatására is.

1/2 A CGMS egyértelműen nagy segítséget jelent a személyre szabott, individuális inzulinkezelés kialakításában és ezáltal a betegek anyagcsere-állapotának javításában.

1/3 Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a CGMS monitorozás alapján elvégzett terápia-módosítás javítja a glikémiás státuszt és hozzájárulhat a késői diabeteszes szövödmények gyakoriságának csökkentéséhez is.

2/1 A CGMS készülék glükóz-szenzora az általunk alkalmazott enzim-inaktivációt követően mint H₂O₂-szenzor biztonsággal alkalmazható a H₂O₂-szint változásainak pontos, szelektív és szenzitív mérésére in vitro körülmények között.

2/2 Az általunk létrehozott H₂O₂-szenzorral a H₂O₂-mérés alsó méréshatára 5 μmol/l körüli.

2/3 BSA és humán plazmamintákban végzett H₂O₂-méréseink a biológiai minták antioxidáns kapacitását igazolták.

3/1 Rövid ideig történő DFP kezelés koncentráció-, és időfüggő módon növeli az eNOS enzimnek mind az aktiváló, mind a gátló oldalláncon történő foszforilációját. A gátló oldallánc foszforilációja minden esetben szignifikánsan nagyobb az aktiváló oldallánc foszforilációjánál.

3/2 DFP hatására az aktiváló/gátló foszforiláció arányának gátló irányba történő eltolódása vezet az eNOS aktivitásának és következményesen az NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenéséhez.

3/3 A GSH szignifikánsan csökkentette az eNOS enzim DFP indukálta foszforilációját mind az aktiváló, mind a gátló oldalláncokon. A gátló foszforiláció aktiváló foszforilációhoz viszonyított csökkenése szignifikánsan nagyobb mértékű volt.

3/4 Az eNOS foszforilációs szabályozásának GSH hatására aktiváló irányba történő eltolódása az eNOS fokozott aktivitásához és a NO biológiai hozzáférhetőségének és ezáltal az endotélfunkciónak a javulásához vezet.

4/1 Az irodalomban elsőként tettünk említést hasnyálmirigy-vese transzplantáció után, a diabétesz és az urémia klinikai remissziójának fázisában kalcifilaxis megjelenéséről.

4/2 Esetünk bizonyítja, hogy diabéteszes betegeknél a sikeres hasnyálmirigy-vese transzplantáció csak látszólagos remissziót hoz, a vaszkulatura korábban elkezdődött károsodása irreverzibilis és progresszív marad.

4/3 Rendszeres kombinált keringésjavító infúziós kezelések mellett jelentősen javítható volt a beteg perifériás véráramlása, ezért az általunk alkalmazott pentoxifillin/pentozán poliszulfát kezelés javasolható kalcifilaxisban szenvedő betegeknél.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Winkler G és Baranyi É: Gyakorlati Diabetológia 2010. A diabetes gondozás vezérfonala. 2010; 4. fejezet: 29-36.
2. Valeri C, Pozzilli P, Leslie D: Glucose control in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20(Suppl 2): S1-S8.
3. Útmutató/Anyagsere-Endokrinológia. Klinikai Irányelvek Kézikönyve: A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegség kezelése és gondozása felnőttkorban. 2010; 43-60.
4. The Diabetes Control and Complication Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1993; 329: 977-86.
5. Tahrani AA, Piya MK, Kennedy A et al: Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 125: 328-61.
6. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352: 837-53.
7. Clinical Practice Recommendations of American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2010; 33 (Suppl 1): 1S-100S.
8. Huisman TH, Martis EA, Dozy A: Chromatography of hemoglobin type on carboxymethylcellulose. *J Lab Clin Med* 1958; 52: 312-27.
9. Homa K and Majkowska L: Difficulties in interpreting HbA_{1c} results. *Pol Arch Med Wewn* 2010; 120(4): 148-54.
10. Tahara Y and Shima K: The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. *Diabetes Care* 1993; 16: 1313-14.
11. Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A et al: Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care*. 1991; 14: 68-72.
12. Niederau CM and Reinauer H: Glycohemoglobins. In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt am Main, Germany: TH Books Verlagsgesellschaft mbH; 1998: 142-148.
13. Koga M and Kasayama S: Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocrine Journal* 2010; 57 (9): 751-62.
14. Auxner-Parham S: Testing to keep tight glycemic control. Is there role for intermediate-term control. *Clin Lab News* 2004; 30: 1-4.
15. Szyborska-Kajane A, Psurek A, Hese R et al: Self-monitoring of blood glucose in treatment of type 2 diabetes. *Diab Res Clin Pract* 2009; 86 S: S49-S52.
16. Cameron FJ, Ambler GR: Does continuous glucose monitoring have clinical utility in contemporary management of diabetes? *J Pediatr Child Health* 2004; 40: 79-84.
17. Metzger M, Leibowitz G, Wainstein J et al: Reproducibility of glucose measurements using the glucose sensor. *Diabetes Care* 2002; 6: 1185-91.

18. Sachedina N, Pickup JC: Performance assessment of the Medtronic-MiniMed Continuous Glucose Monitoring System and its use for measurement of glycaemic control in type 1 diabetic subjects. *Diabetic Medicine* 2003; 20: 1012-15.
19. Skyler JS: Continuous glucose monitoring: an overview of its development. *Diab Technol Ther* 2009; 11(S1): S5-S7.
20. Cengiz E and Tamborlane WV: A tale of two compartments: interstitial versus blood glucose monitoring. *Diab Technol Ther* 2009; 11(S1): S11-S16.
21. Cheyne E, Kerr D: Making 'sense' of diabetes: using a continuous glucose sensor in clinical practice. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18 (Suppl 1): S43-S48.
22. Tóth-Heyn P, Körner A, Madácsy L: A folyamatos glükózszenzor (CGMS) értékes eszköz a gyermek- és serdülőkori diabetes mellitus gondozásában. *Orv Hetilap* 2004; 24: 1265-70.
23. Ludvigsson J, Hanas R: Continuous subcutaneous glucose monitoring improved metabolic control in pediatric patients with type 1 diabetes: a controlled crossover study. *Pediatrics* 2003; 5: 933-38.
24. Schaepelynck-Belicar P, Vague P, Simonin G et al: Improved metabolic control in diabetic adolescents using the Continuous Glucose Monitoring System (CGMS). *Diabetes Metab* 2003; 6: 608-12.
25. Praet SFE, Manders RJF, Meex RCR et al: Glycaemic instability is an underestimated problem in type II diabetes. *Clinical Science* 2006; 111: 119-26.
26. Boyne MS, Silve DM, Kaplan J et al: Timing of changes in interstitial and venous blood glucose measured with a continuous subcutaneous glucose sensor. *Diabetes* 2003; 52: 2790-94.
27. Cengiz E and Tamborlane WV: A tale of two compartments: interstitial versus blood glucose monitoring. *Diab Technol Ther* 2009; 11(S1): S11-S16.
28. Rebrin K, Steil GM: Can interstitial glucose assessment replace blood glucose measurements? *Diabetes Technol Ther* 2000; 3: 461-72.
29. Kubiak T, Hermanns N, Schreckling HJ et al: Assessment of hypoglycaemia awareness using continuous glucose monitoring. *Diabetic Medicine* 2004; 21: 487-90.
30. McGowan K, Thomas W, Moran A: Spurious reporting of nocturnal hypoglycaemia by CGMS in patients with tightly controlled type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 9: 1499-1503.
31. Tanenberg R, Bode B, Lane W et al: Use of the Continuous Glucose Monitoring System to guide therapy in patients with insulin-treated diabetes: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 2004; 79(12): 1521-26.
32. Diabetes Research in Children Network Study Group: Evaluation of factors affecting CGMS calibration. *Diab Technol Ther* 2006; 8(3): 318-25.
33. Circu ML, Aw TY: Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Rad Biol Med* 2010; 48: 749-62.
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
35. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF et al: Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1997; 99 424-32.

36. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M et al: Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. Review article. Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation Volume 2010; Article ID 453892, 11 pages
37. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS: Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005; 25: 29-38.
38. Monnier L, Mas E, Ginet C et al: Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295(14): 1681-87.
39. Brownlee M: The pathophysiology of diabetic complications; a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-25.
40. Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS et al: Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor α -mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 1999; 274(35): 25078-84.
41. Ding H and Triggle CR: Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2010; DOI 10.1007/s00424-010-0807-3
42. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis os type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 2002; 35(5): 599-622.
43. Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J et al: Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? Critical review *IUBMB Life* 2000; 50: 251-57.
44. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE: Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J. Neurosci Res* 1999; 55: 659-65.
45. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW: Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; 16: 291-303.
46. Ellis EA, Guberski DL, Somogyi-Mann M et al: Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/WOR Diabetic rat. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 91-101.
47. Peiró C, Lafuente N, Matesanz N et al: High glucose induces cell death of cultured aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 967-74.
48. Abe J, Berk BC: Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species *J Biol Chem* 1999; 274: 21003-10.
49. Avshalumov MV, Chen BT, Marshall SP et al: Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *J. Neurosci* 2003; 23: 2744-50.
50. Chen G, Suzuki H, Weston AH: Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 1165-74.
51. Feletou M, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 515-24.
52. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M et al: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106:1521-30.
53. Shimokawa H: Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2010; 459: 915-22.
54. Halliwell B, Clement MV, Long LH: Hydrogen peroxide in human body. (Minireview) *FEBS lett.* 2000; 486: 10-13.

55. Rinaldi M, Moroni P, Paape MJ et al: Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115: 107–25.
56. Soh N: Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 2006; 386: 532-43.
57. Nagano T: Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 45: 111-24.
58. Frew JE, Jones P, Scholes G: Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solution. *Anal Chim Acta* 1983; 155: 139-42.
59. Deskur E, Przywarska I, Dylewicz P: Exercise-induced increase in hydrogen peroxide plasma levels is diminished by endurance training after myocardial infarction. *Int J Card* 1998; 67: 219-24.
60. Guilbault GG, Lubrano GJ: An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal Chim Acta* 1973; 64: 439-55.
61. Nagy L, Nagy G, Gyurcsányi RE et al: Development and study of an amperometric biosensor for the in-vitro measurement of low concentration of putrescine in blood. *J Biochem Biophys Methods* 2002; 53: 165-75.
62. Murphy LJ: Reduction of Interference Response at a Hydrogen Peroxide Detecting Electrode Using Electropolymerized Films of Substituted Naphthalenes. *Anal Chem* 1998; 70: 2928 -35.
63. Karyakin AA, Karyakina EE, Gorton L: On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian blue modified electrodes. *Electrochem Commun* 1999; 1: 78-82.
64. Lin Y, Cui X, Li L: Low-potential amperometric determination of hydrogen peroxide with a carbon paste electrode modified with nanostructured cryptomelanotype manganese oxides. *Electrochem Commun* 2005; 7: 166-72.
65. Ricci F, Palleschi G: Sensor and biosensor preparation, optimization and applications of Prussian blue modified electrodes. *Biosens Bioelectron* 2005; 21: 389-407.
66. Heller A: Electrical wiring of redox enzymes. *Acc Chem Res* 1990; 23: 128-34.
67. Willner B, Katz E, Willner I: Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17: 589-96.
68. Ahmed S, Dack C, Farace G et al: Tissue implanted glucose needle electrodes: early sensor stabilization and achievement of tissue-blood correlation during the run in period. *Analytica Chimica Acta* 2005; 537: 153-61.
69. Meulemans A: Production of hydrogen peroxide in rat corpus cavernosum: An on-line study with microvoltammetric electrodes. *CR Biol* 2005; 328: 834-40.
70. Kulagina NV, Michael AC: Monitoring hydrogen peroxide in extracellular space of the brain with amperometric microsensors. *Anal Chem* 2003; 75: 4875-81.
71. Wilson R and Turner APF: Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens Bioelectron* 1991; 7: 165-85.
72. Greenfield PF, Kittrell JR and Laurence RL: Inactivation of immobilized glucose oxidase by hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 1975; 65: 109-24.
73. Faure P, Troncy L, Lecomte M et al: Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab* 2005; 31: 169-77.
74. Halliwell B: Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141: 312-22.
75. Ludvigsson J, Isacson L: Clinical use of glucose sensors in the treatment of diabetes in

- children and adolescents. *Pract Diab Int* 2003; 20: 7-12.
76. Kerner W, Kiwit M, Linke B et al: The function of a hydrogen peroxide-detecting electroenzymatic glucose electrode is markedly impaired in human sub-cutaneous tissue and plasma. *Biosens Bioelectron* 1993; 8: 473-82.
77. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int J Biochem and Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
78. Lusher TF, Noll G: Endothelial function as an end-point in interventional trials: concepts, methods and current data. *J Hypertens* 1996; 14: S111-S119.
79. Li H, Förstermann U: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-54.
80. Harris MB, Ju H, Venema VJ, et al: Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 16587-91.
81. Smith CJ, Fischer TH: Particulate and vapour phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 158: 257-67.
82. Michaud SE, Dussault S, Groleau J et al: Cigarette smoke impairs VEGF-induced endothelial cell migration: Role of NO and reactive oxygen species. *J Molec Cell Card* 2006; 41: 275-84.
83. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S et al: Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase. An in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2003, 107: 2342-47.
84. Carnevali S, Petruzelli S, Longoni B et al: Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molec Phys* 2003; 284: L955-L963.
85. Celermajor DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88: 2149-55.
86. Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, et al.: Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:17625-8.
87. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B et al.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601-5
88. Montagnani M, Chen H, Barr V A et al.: Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser¹¹⁷⁹. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:30392-398
89. Thomas SR, Chen K, Keaney JF: Hydrogen peroxide activates endothelial nitric oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 6017-24.
90. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S et al.: Phosphorylation of Thr⁴⁹⁵ regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation Research* 2001; 88:68-75.
91. Mazák I, Wittmann I, Wagner L, et al.: Cigarette smoke and its formaldehyde component inhibit bradykinin-induced calcium increase in pig aortic endothelial cells. *Endothelium* 2002; 9:103-8.
92. Nagy J, Demaster EG, Wittmann I et al.: Induction of endothelial cell injury by cigarette smoke. *Endothelium* 1997; 5:251-63.
93. Circu ML, Aw TY: Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2010;48:749-62.

94. Feletou M and Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: A multifaceted disorder. (The Wiggers Award Lecture) *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2006; 291:H985-H1002.
95. Baylis C: Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nature Clinical Practice. Nephrology* 2006; 2: 209-20.
96. Su Y, Han W, Giraldo C et al: Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Resp Cell Molec Biol* 1998; 19: 819-25.
97. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ et al: Disfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium dependent vasodilation. *Circulation* 2001; 104: 1905-10.
98. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J et al: Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability. Role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension* 2006; 48: 278-85.
99. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB et al: Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium dependent vasodilation caused by hyperlycaemia in humans. *Circ Res* 2002; 90: 107-11.
100. Török L, Középessy L, Suhajda K: Secunder, nephrogen hyperparathyreosis mellett fellépő cutan gangraena. *Orv Hetilap* 1991; 5: 259-264
101. Rogers NM, Coates PTH: Calcific uraemic arteriolopathy: an update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2008; 17: 629-634
102. Howe SC, Murray JD, Reeves RT et al: Calciphylaxis, a poorly understood clinical syndrome: three case reports and a review of the literature. *Ann Vasc Surg* 2001; 15: 470-473
103. Selye H, Savoie L: Calciphylaxis of the blood vessels. *Zentralbl Chir* 1967; 92: 14932.
104. Hafner J, Keusch G, Wahl C et al: Calciphylaxis: a syndrome of skin necrosis and acral gangrene in chronic renal failure. *Vasa-J Vascular Dis* 1998; 3: 137-143.
105. Nigwekar SU, Wolf M, Sterns RH et al: Calciphylaxis from nonuremic causes: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:1139-1143
106. Kalajian AH, Malhotra PS, Callen JP et al: Calciphylaxis with normal renal and parathyroid function. Not as rare as previously believed 2009; 145(4):451-458.
107. Schafer C, Heiss A, Schwarz A et al: The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003; 112(3): 357-66.
108. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M et al: Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes* 2002; 51: 2450-58.
109. Hafner J: Differential ulcer cruris diagnosis. *Ther Umsch* 1998; 55 (10): 632-642.
110. Aabed G, Al Furayh O, Al-Lehbi A et al: Calciphylaxis-associated second renal graft failure and patient loss. Case report and review of the literature. *Exp and Clin Transplant* 2008; 6: 287-93.
111. Mazzaferro S, Pasquali M, Taggi F et al: Progression of coronary artery calcification in renal transplantation and the role of secondary hyperparathyroidism and inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 685-690.
112. Wilmer WA, Magro CM: Calciphylaxis: Emerging Concepts in Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Semin Dialysis* 2002; 15(3): 172-186.
113. Ketteler M: Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 337-42.
114. Ketteler M, Vermeer C, Wanner C et al: Novel insights into uremic vascular calcification: role of matrix

Gla protein and alpha-2-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin. *Blood Purif* 2002; 20: 473-76.

115. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M et al: Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes* 2002; 51: 2450-58.

116. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W et al: Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 295-301.

117. Alikadic N, Kovac D, Krasna M et al: Review of calciphylaxis and treatment of a severe case after kidney transplantation with iloprost in combination with hyperbaric oxygen and cultured autologous fibrin-based skin substitutes. *Clin Transplant* 2009; 23: 968-74.

9. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

1. PhD értekezéssel kapcsolatos publikációk

Angol nyelven

I. M. Tamaskó, L. Nagy, E. Mikolás, G. A. Molnár, I. Wittmann, G. Nagy: An approach to in situ detection of hydrogen peroxide; application of a commercial needle type electrode. *Physiological Measurement* 2007; 28: 1533–42. **(Impact Factor: 1.412)**

II. L. Wagner*, B. Laczy*, **M. Tamaskó**, I. Mazák, L. Markó, G. A. Molnár, Z. Wagner, M. Mohás, J. Cseh, A. Fekete, I. Wittmann: Cigarette Smoke-Induced Alterations in Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation: Role of Protein Kinase C. *Endothelium* 2007; 14(4): 245-55. **(Impact Factor: 1,740)**

III. L. Wagner, B. Laczy, **M. Tamaskó**, I. Mazák, L. Markó, G. Molnár, Z. Wagner, M. Mohás, J. Cseh, A. Fekete, I. Wittmann: The effect of cigarette smoke on the phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinase C. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(S6): vi243-44. **(Impact Factor: 3,167) (ABSZTRAKT)**

IV. I. Wittmann, P. Degrell, G.A. Molnár, **M. Tamaskó**, K. Kalmár Nagy, E. Schmidt, E. Fehér, L. Kalabay, B. Laczy, L. Wagner, Z. Wagner, J. Nagy: Diagnosis and successful management of calciphylaxis in a pancreas-kidney transplant patient. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(7): 1520-21. **(Impact Factor: 2.976)**

Magyar nyelven

V. Tamaskó M., Molnár G. A., Wagner Z., Mazák I., Vágási K., Wagner L., Laczy B., Markó L., Mohás M., Nagy J., Wittmann I.: Folyamatos intersticiális cukormonitorozással (CGMS) javítható a glikémia diabeteszes betegekben. Előzetes eredmények. *Diabetologia Hungarica* 2005; 13(4): 229-35. (A *Diabetológia Hungarica* 2005. évi legjobb közleménye a 35 év alattiak kategóriájában.)

VI. Tamaskó Mónika dr., Molnár Gergő Attila dr., Laczy Boglárka dr., Markó Lajos dr., Wagner László dr., Wagner Zoltán dr., Nagy Judit dr., Wittmann István dr.: Folyamatos cukormonitorozással (CGMS) javítható a glykaemia diabeteszes betegekben. *Pancreas-vese*

transzplantáció hatása a szénhidrát-anyagcserére. Diabetologia Hungarica 2006; 14(S2):161-62. **(ABSZTRAKT)**

VII. Tamaskó M, Nagy L, Mikolás E, Nagy G, Wittmann I: H₂O₂ mérése egy elektroenzimatikus szenzor segítségével. Folia Hepatol 2007; 11(S3): 37. **(ABSZTRAKT)**

VIII. Wagner L, Tamaskó M., Laczy B., Molnár G., Wagner Z., Kovács T., Wittmann I., Nagy J.: A dohányzás akut hatása az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) enzimre. Hypertonia és Nephrologia 2003; 7(S3): 91. **(ABSZTRAKT)**

IX. Tamaskó M., Wagner L., Laczy B., Molnár G.A., Wagner Z., Markó L., Mohás M., Nagy J., Wittmann I.: Az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) enzim foszforilációjának szerepe a dohányzás okozta endotél diszfunkció kialakulásában. Hypertonia és Nephrologia 2004; 8(S4): 115. **(ABSZTRAKT)**

X. Wagner L, Laczy B, Boros AG, Tamaskó M, Mikolás E, Szijártó IA, Markó L, Mohás M, Cseh J, Fekete A, Wittmann I: Kivédhető-e a dohányzás nitrogén monoxid-termelést csökkentő hatása? Folia Hepatol 2007; 11(S3): 40-41. **(ABSZTRAKT)**

XI. Wagner L, Laczy B, Cseh J, Tamaskó M, Mazák I, Markó L, Molnár GA, Wagner Z, Mohás M, Fekete A, Wittmann I: Cigarettafüst okozta elváltozások az endothelsejtekben. Hypertonia és Nephrologia 2010; 14(3): 153-8.

XII. Tamaskó M., Kalmár Nagy K., Degrell P., Molnár G. A., Dérczy K., Schmidt E., Kalabay L., Wagner L., Wagner Z., Mazák I., Laczy B., Markó L., Mohás M., Nagy J., Wittmann I.: Végtagi gangraenát okozó calciphylaxis pancreas-vese transzplantáción átesett betegünkénél. A fetuin lehetséges szerepe. Magyar Belorv Arch 2004; 57(4): 190-93.

Nem idézhető tudományos előadás

XIII. L. Wagner, M. Tamaskó, B. Laczy, G. Molnár, Z. Wagner, T. Kovács, J. Nagy, I. Wittmann: The acute effect of smoking on the endothelial nitric oxide synthase enzyme in endothelial cells. Abstract Book of the XLI Congress of the European Renal Association 2004; p. 29.

2. PhD értekezéshez nem kapcsolódó publikációk

Angol nyelven

Közlemények

Wittmann, G.A. Molnár, P. Degrell, Z. Wagner, **M. Tamaskó**, B. Laczy, P. Brasnyó, L. Wagner, J. Nagy: Prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Diab Res Clin Pract* 2005; 68(S1): S36-42. **(Impact Factor: 1.236)**

G. A. Molnár, Z. Wagner, L. Markó, T. Kőszegi, M. Mohás, B. Kocsis, Z. Matus, L. Wagner, **M. Tamaskó**, I. Mazák, B. Laczy, J. Nagy, I. Wittmann: Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int* 2005; 68(5): 2281-87. **(Impact Factor: 4.927)**

Z. Wagner, M. Molnár, G. A. Molnár, **M. Tamaskó**, B. Laczy, L. Wagner, B. Csiky, A. Heidland, J. Nagy, I. Wittmann: Serum Carboxymethyl-lysine Predicts Mortality in Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 294-300. **(Impact Factor: 4.072)**

I. Wittmann, G. A. Molnár, L. Wagner, T. Kőszegi, Z. Wagner, B. Laczy, **M. Tamaskó**, L. Markó, M. Mohás, J. Nagy: Single dose of acetylsalicylic acid in patients with Type 2 diabetes mellitus and/or chronic renal failure ameliorates anaemia by decreasing the rate of neocytolysis. *Act Physiol Hun* 2007; 94(1-2): 159-66. **(Impact Factor: 0,453)**

Molnar GA, Boros AG, Pótó L, **Tamaskó M**, Wittmann I: The Poincaré plot, but not the correlation R value is a good marker of temporal variability of CGMS data *Diab Technol Ther* 2008; 10(6):506-7. **(Impact Factor: 2,127)**

Mohás M, Szigeti N, Markó L, Molnár GA, Cseh J, Laczy B, **Tamaskó M**, Balla J, Kappelmayer J, Wagner L, Wagner Z, Csiky B, Nagy J, Wittmann I: Serum total LDH activity and LDH-2 isozyme in nephritic syndrome. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31(1): 47-54. **(Impact Factor: 1,208)**

Laczy B, Cseh J, Mohás M, Markó L, **Tamaskó M**, Koszegi T, Molnár GA, Wagner Z, Wagner L, Wittmann I: Effects of pentoxifylline and pentosan polysulphate combination

therapy on diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol 2009; 46(2): 105-11. **(Impact Factor: 1,549)**

Idézhető konferencia absztraktok

M. Tamaskó, G. A. Molnár, B. Laczy, Z. Wagner, L. Wagner, T. Kőszegi, B. Kocsis, I. Mazák, J. Nagy, I. Wittmann: Anaemia caused by oxidative stress in type 2 diabetes mellitus and azotaemia might be decreased by the free radical scavenger acetylsalicylic acid. Nephrol Dial Transplant 2005; 20(S4): iv267. **(Impact Factor: 2,976)**

Z. Wagner, M. Molnár, G.A. Molnár, **M. Tamaskó**, B. Laczy, L. Markó, B. Csiky, A. Heidland, J. Nagy, I. Wittmann: Serum carboxymethyl-lysine level predicts mortality in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2005; 20(S5): v306. **(Impact Factor: 2,976)**

I. Wittmann, L. Markó, P. Degrell, G.A. Molnár, **M. Tamaskó**, B. Laczy, M. Mohás, Z. Wagner, L. Wagner, J. Nagy: Proteinuria leads to nephron-loss and this way to atherosclerosis in diabetes mellitus. Acta Physiol Hun 2005; 92(3-4): 322-23.

Magyar nyelven

Közlemények

Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Melegh B., Kőszegi T., Degrell P., Bene J., **Tamaskó M.**, Laczy B., Nagy J., Wittmann I: Az angiotenzin-konvertáló enzim gén polimorfizmusa befolyása a szénhidrát anyagcserére, az oxidatív stresszre és a célszerv-károsodásra 2-es típusú diabetesben. Orv Hetilap 2004; 145(16): 855-59.

Wittmann I., Molnár G.A., Fehér E., Wagner Z., **Tamaskó M.**, Laczy B., Póto L., Kőszegi T., Wagner L., Kocsis B., Nagy J.: A carotis intima-média vastagságával összefüggő tényezők 2-es típusú diabetes mellitusban. Metabolizmus 2004; 2(2): 75-80.

Wagner Z., Molnár G.A., Mazák I., Vas T., Wagner L., **Tamaskó M.**, Laczy B., Nagy J., Wittmann I.: A nem-enzimatis glikáció aterogén hatásának mechanizmusa diabetes mellitusban és veseelégtelenségben. Metabolizmus 2004; 2(3): 130-134.

Wagner Z., Molnár G.A., Mazák I., Vas T., Wagner L., **Tamaskó M.**, Laczy B., Nagy J., Wittmann I.: Az előrehaladott glikációs végtermékek akkumulációja - a vesefunkció romlás, mint az atherosclerosis rizikófaktora. *Metabolizmus* 2004; 2(4): 7-10.

Wagner Z., Degrell P., Mazák I., Vas T., Molnár G.A., Wagner L., Laczy B., **Tamaskó M.**, Nagy J., Wittmann I.: A metilglioxál sejtkárosító hatásának vizsgálata izolált vörösvértestekben - a glomeruláris típusú vörösvértestek képződésének modellje. *Hypertonia és Nephrológia* 2005; 9(1): 24-29.

Szelestei T., Wagner Z., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Wagner L., Kocsis B., Markó L., Mohás M., Laczy B., Nagy J., Wittmann I.: L-arginin analógok szérumszintje valamint a glutation peroxidáz és kataláz gének variációi 2-es típusú cukorbetegekben. *Magyar Belorv Arch* 2005; 58(1): 7-10.

Wittmann I., Molnár G. A., Wagner L., Wagner Z., **Tamaskó M.**, Laczy B., Brasnyó P., Halmai R., Markó L., Nagy J.: A metabolikus szindróma két koncepciójának összehasonlítása: WHO-kritériumok és ATP III-feltételrendszer. *Diabetologia Hungarica* 2005; 13(4): 263-72.

Wittmann I., Wagner L., Wagner Z., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Markó L., Mohás M., Nagy J.: Cukorbeteg kóros albuminuriája mint cardiovascularis kockázati tényező. *Lege Artis Medicinae* 2005; 15(12): 891-95.

Wittmann I., Markó L., Wagner L., Wagner Z., Molnár G. A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Mohás M., Boros A. G., Nagy J.: Proteinuria diabetes mellitusban. *Medicus Anonymus* 2005; 13(12):13-15.

Maász A., Horvatovich K., Magyar L., Talián Cs.G., Bokor Sz., Laczy B., **Tamaskó M.**, Molnár D., Wittmann I., Melegh B.: Mitokondriális DNS T4291C mutáció vizsgálata metabolikus szindrómában szenvedő betegekben. *Orv Hetilap* 2006; 147(15): 693-6.

Laczy B., Molnár G.A., Kőszegi T., Wagner L., Wagner Z., **Tamaskó M.**, Markó L., Mohás M., Wittmann I.: Az acetyl-szalicilsav egyszeri, nagy dózisban javítja az anaemiát 2-es típusú

diabetes mellitusban és krónikus veseelégtelenségben a neocytolysis gátlásán keresztül. Magyar Belorv Arch 2006; 61: 274-80.

Wittmann I., Markó L., Molnár G. A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Mohás M., Cseh J., Wagner Z., Wagner L.: Az endotheldysfunctio gyógyszeres kezelése. Granum 2006; 9(4): 7-10.

Mohás M., Markó L., Molnár G. A., Cseh J., Laczy B., **Tamaskó M.**, Balla J., Kappelmayer J., Wagner L., Wagner Z., Csiky B., Nagy J., Wittmann I.: A szérum LDH-aktivitás és a vese-LDH izoenzim jelentősége nephrosis szindrómában. Magyar Belorv Arch 2006; 57: 47-51.

Wittmann I., Molnár G. A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Markó L., Mohás M., Cseh J., Wagner Z., Wagner L.: A protein kináz C- β szelektív gátlásának jelentősége a diabeteses microvascularis szövödmények kezelésében. Diabetologia Hungarica 2006; 14(S4):13-18 (felkért összefoglaló)

Laczy B., Markó L., **Tamaskó M.**, Cseh J., Kőszegi T., Wagner L., Wagner Z., Molnár G. A., Mohás M., Wittmann I.: A pentoxifyllin és pentosan polysulphat kombinációs kezelés hatása a diabeteses neuropathiára 2-es típusú diabetes mellitusban. Diabetologia Hungarica 2007; 15(1): 21-29.

Wittmann I, Wagner L, Markó L, **Tamaskó M**, Laczy B, Márton M, Cseh J, Melegh B: A hereditær hemochromatosis jelentősége a diabeteses betegek gondozásában. Orv Hetilap 2007; 148(3):111-15.

Szakmai ajánlás

Wittmann I., Markó L., Degrell P., Molnár G. A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Mohás M., Wagner Z., Wagner L., Nagy J.: A proteinuria nephronpusztuláshoz és ezáltal atherosclerosishoz vezet diabetes mellitusban. Nephrológiai Útmutató. A Magyar Nephrológiai Társaság szakmai irányelvei. Szerk.: Túri S., Mátyus J., Kiss I., Kárpáti I. Medition Kiadó, Budapest, 2005. 147-152. old.

Idézhető konferencia absztraktok

Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., **Tamaskó M.**, Laczy B., Matus Z., Kocsis B., Kőszegi T., Nagy J., Wittmann I.: A szelektív hidroxil szabad gyök marker, a vizelet orto-/para-tirozin hányados jelentősége diabetesben, diabeteses és nem-diabeteses azotaemiában. *Diabetologia Hungarica* 2004; 11(S1): 91-92.

Wagner L., Laczy B., Wagner Z., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Szelestei T., Nagy J., Wittmann I.: Az endogén erythropoietin iránti érzékenység csökkent 2-es típusú diabetes mellitusban és azotaemiában. *Diabetologia Hungarica* 2004; 11(S1): 155-57.

Wagner Z., Molnár G.A., Fehér E., **Tamaskó M.**, Laczy B., Pótó L., Kőszegi T., Wagner L., Édel Zs., Nagy J., Wittmann I.: Az arteria carotis intima-media vastagságának rizikófaktorai 2-es típusú diabetes mellitusban. *Diabetologia Hungarica* 2004; 11(S1): 157-58.

Wittmann I, Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Wagner Z., Wagner L., Fehér E., Melegh B., Kőszegi T., Nagy J.: A szérum gamma-GT-, LDH- és fruktózamin-szint, illetve az albuminuria, a vérnyomás összefügg az ACE-gén polimorfizmussal, a CRP-vel és a vesefunkcióval 2-es típusú diabetesben. *Diabetologia Hungarica* 2004; 11(S1): 161-62.

Szelestei T., Wagner Z., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Wagner L., Kocsis B., Nagy J., Wittmann I.: L-arginin analógok szérum szintje és a glutation-peroxidáz és kataláz gének variációi 2-es típusú cukorbetegségben. *Diabetologia Hungarica* 2004; 11(S1): 132-33.

Wagner L., Laczy B., Wagner Z., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Mazák I., Markó L., Mohás M., Nagy J., Wittmann I.: Az azotaemiában és 2-es típusú diabetes mellitusban (DM) kialakuló erythropoetin (EPO) rezisztencia acetilszalicilsavval áttörhető.

Hypertonia és Nephrologia 2004; 8(S4): 94.

Markó L., Molnár G.A., Wagner Z., Kőszegi T., **Tamaskó M.**, Laczy B., Wagner L., Mazák I., Degrell P., Matus Z., Kocsis B., Mohás M., Nagy J., Wittmann I.: Összefüggés egy vizelet hidroxil szabad gyök marker és a vörösvértestképzés között.

Hypertonia és Nephrologia 2004; 8(S4): 94.

Wagner Z., Molnár M., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Markó L., Mohás M., Nagy J., Wittmann I.: Az előrehaladott glikációs végtermékek szérumban szintjét meghatározó tényezők dializált betegekben. *Hypertonia és Nephrologia* 2004; 8(S4): 115.

Wittmann I., Wagner L., Laczy B., Molnár G. A., Wagner Z., **Tamaskó M.**, Mazák I., Markó L., Mohás M., Nagy J.: A 2-es típusú diabetes mellitusban és azotaemiában kialakuló erythropoetin-rezisztencia acetilszalicilsavval áttörhető. *Magyar Belorv Arch* 2004; S2: 145.

Tamaskó M., Mohás M., Vas T., Kőszegi T., Molnár G. A., **Laczy B.**, Wagner L., Wagner Z., Markó L., Plávics E., Nagy J., Wittmann I.: A szérumban laktát dehidrogenáz aktivitás prediktív értéke nephrosis-szindrómában. *Hypertonia és Nephrologia* 2005; 9(S4): 71.)

Laczy B., **Tamaskó M.**, Molnár G. A., Cseh J., Kőszegi T., Markó L., Wagner Z., Wagner L., Nagy J., Wittmann I.: Elővizsgálat arról, hogy a pentoxifyllin kezelés hogyan befolyásolja a diabeteses neuropathiát és az albuminuriát. *Hypertonia és Nephrologia* 2005; 9(S4): 83.

Laczy Boglárka dr., **Tamaskó Mónika dr.**, Kőszegi Tamás dr., Markó János dr., Wagner László dr., Wagner Zoltán dr., Nagy Judit dr., Wittmann István dr.: A pentoxifyllin- és SP54-kezelés kedvezően befolyásolja a diabeteses neuropathiát és az albuminuriát. Előzetes eredmények. *Diabetologia Hungarica* 2006; 14(S2): 98-99.

Brasnyó Pál dr., Laczy Boglárka dr., **Tamaskó Mónika dr.**, Molnár Gergő Attila dr., Wagner Zoltán dr., Gallyas Ferenc dr., Wittmann István dr., Sümegi Balázs dr.: A rezveratrol hatásainak elővizsgálata 2-es típusú diabetes mellitusos betegekben. *Diabetologia Hungarica* 2006; 14(S2): 27-28.

Brasnyó P., Laczy B., **Tamaskó M.**, Molnár G.A., Wagner Z., Gallyas F., Nagy J., Wittmann I., Sümegi B.: A rezveratrol in vivo hatásai 2-es típusú diabetes mellitusos betegekben. *Magyar Belorv Arch Suppl* 2006; 59(S2): 46-47.

Laczy B., **Tamaskó M.**, Wagner Z., Wagner L., Kőszegi T., Molnár G.A., Markó L., Mohás M., Cseh J., Nagy J., Wittmann I.: A pentoxifyllin- és pentozán-poliszulfát kombinációs kezelés előnyösen befolyásolja a diabeteses neuropathiát és az albuminuriát. *Magyar Belorv Arch Suppl* 2006; 59(S2):104-105.

Markó L., Molnár G.A., Wagner Z., Wagner L., Matus Z., Kőszegi T., Laczy B., **Tamaskó M.**, Mohás M., Cseh J., Nagy J., Wittmann I.: Vizelet fehérje glikoxidációs termékek meghatározása diabeteses betegekben. Magyar Belorv Arch Suppl 2006; 59 (S2): 111-12.

Tamaskó M., Kalmár Nagy K., Pótó L., Boros A.G., Molnár G.A., Laczy B., Markó L., Wagner L., Wagner Z., Nagy J., Wittmann I.: A vércukorszint-oszcilláció szabályozásának vizsgálata cukorbetegben. Magyar Belorv Arch Suppl 2006; 59 (S2): 167-68.

Wagner Z., Molnár M., Molnár G.A., **Tamaskó M.**, Laczy B., Wagner L., Csiky B., Nagy J., Wittmann I.: Az előrehaladott glikációs végtermékek szérumszintje hemodializált betegekben a halálozás prediktora. Magyar Belorv Arch Suppl 2006; 59 (S2): 181-82.

Cseh J, Brasnyó P, Mohás M, Laczy B, **Tamaskó M**, Molnár GA, Wagner Z: Transz-rezveratrol in vivo hatásainak vizsgálata 2-es típusú diabetes mellitusos betegekben. Előzetes eredmények. Folia Hepatol 2007; 11(S3): 12-13.

Egyéb, nem idézhető tudományos előadások és poszterek

Tamaskó M, Kalmár NK, Pótó L, Boros AG, Molnár GA, Laczy B, Markó L, Wagner L, Wagner Z, Cseh J, Nagy J, Wittmann I: A rövid távú vércukorszint-oszcilláció pancreas-vese transzplantáltakban. Magyar Transzplantációs Társaság VIII. Kongresszusa, Zalakaros, 2006. november 23-25. Programfüzet és előadás összefoglalók 33. oldal

Tamaskó M, Nagy L, Nagy G, Wittmann I: CGMS szenzor alkalmazásával szerzett klinikai és in vitor tapasztalatok. Kémiai Szenzorika Kutatócsoport Kongresszusa Pécs, 2007.

A szerző impact factor adatai:

Közlemény:	16,597
Esetismertetés:	2,976
Letter to the Editor:	2,127
Idézhető konferencia absztrakt:	9,119
Összesített impact factor:	30,819

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával mondok köszönetet a II. sz. Belgyógyászati Klinika minden munkatársának - orvosoknak és nővéreknek egyaránt - akik bevezettek az orvoslás és a kutatás világába, kiváló szemléletet adtak, megtanítottak gondolkodni és dolgozni és akikkel kezdőként megtisztelő volt egy csapatot alkotni.

Ezúton is külön köszönetemet fejezem ki,

Prof. Dr. Wittmann Istvánnak, aki kutatási tevékenységem irányvonalait meghatározta, tudományos munkámat vezette és kiváló tanárként megtanított a tudományos prezentáció gyakorlatára is.

Prof. Dr. Nagy Juditnak, akinek igen nagy szerepe volt abban, hogy belgyógyász lettem és aki gyógyító és tanító tevékenységével példaképemmé vált.

Nagy tisztelettel fejezem ki köszönetemet **Dr. Sulyok Endre Professzor Úrnak**, aki a munkahelyváltást követően új témavezetőként segítő jobbot nyújtott és munkámat mindenben támogatta.

Külön köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Nagy Gézának** a PTE TTK Fizikai Kémiai Tanszék tanszékvezető egyetemi tanárának és **Dr. Nagy Líviának** az MTA Kémiai Szenzorika Kutatócsoport munkatársának, hogy fáradhatatlan munkájukkal és végtelen türelmükkel próbáltak bevezetni a bioszenzorok érdekes, ismeretlen világába. Köszönöm, hogy vizsgálataimat hosszú időn keresztül intézetükben végezhettem.

Dr. Wagner Lászlónak, aki által megkezdett tudományos „ösvényre” léptem, aki a kutatás legnehezebb pillanataiban is segítséget és baráti támogatást nyújtott.

Dr. Molnár Gergő Attilának, aki barátként és munkatársként is mellettem állt, és aki az évek során felsorolhatatlanul sok segítséget nyújtott.

Dr. Degrell Péternek, aki szakmai alaposságra és gondolkodásra tanított.

Az egykori TDK-, majd PhD hallgatónak **Dr. Laczy Boglárkának** akivel a laboratóriumban együtt dolgoztunk-tanultunk.

Heitmanné Lendvai Anikónak és **Sámikné Varga Ilonának**, akik a laboratóriumi munkában segítettek.

Külön köszönöm nagymamám mindig támogató, megértő szeretetét, mellyel életem minden pillanatában segíteni tud. Köszönöm szüleim támogatását, valamint férjem segítségét és türelmét.