

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Dr. Tamaskó Mónika**

Pécsi Tudományegyetem  
Egészségtudományi Kar

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kriszbacher Ildikó

Témavezető: Prof. Dr. Sulyok Endre

Pécs, 2011

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BMI	body mass index (testtömegindex)
BSA	bovine serum albumin (marha szérumalbumin)
cGMP	ciklikus guanozin-5'-monofoszfát
CGMS	Continuous Glucose Monitoring System (folyamatos cukormonitorozó készülék)
DFP	dohányfüst puffer
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintáz
frukt	fruktózamin
GSH	redukált glutation
HbA <sub>1c</sub>	hemoglobin A <sub>1c</sub>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NUC	non-uremic calciphylaxis (nem urémiás kalcifilaxis)
PBS	phosphate buffer solution (foszfát puffer oldat)
ROS	reactive oxygen substrate (reaktív oxigén származék)
SDS PAGE	sodium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SEM	standard error of the mean (az átlag standard hibája)
SSA	sulfosalicylic acid (szulfoszalicilsav)

## **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. Munkánk során egyrészt a folyamatos cukormonitorozáson alapuló személyre szabott terápiának a jobb glikémiás kontroll és ezáltal a szövődmények rizikójának csökkentésében betöltött szerepét igazoltuk. Jól ismert az oxidatív stressznek a diabétesz mellitusz patogenezisében és szövődményeinek kialakulásában betöltött központi szerepe. További kísérleteink során a vaszkuláris szövődmények háttérében álló oxidatív stressz monitorozásának egy új lehetőségét dolgoztuk ki. Emellett endotélsejteken végzett kísérleteinkkel az érszövődmények további major rizikófaktorának számító dohányzás endotél-diszfunkciót okozó hatásának eddig ismeretlen mechanizmusát igazoltuk. Esettanulmányunk pedig egy másik vaszkuláris szövődmény, a kalcifilaxis irreverzibilis és progresszív voltát mutatja be.

## **3. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK**

3.1. 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 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. Vizsgálatunk célja a CGMS készülékkel végzett cukorszint-monitorozás előnyeinek meghatározása volt a hagyományos ujjbegyi vércukorméréshez képest. Vizsgáltuk, hogy a CGMS mennyivel alkalmasabb a vércukor ingadozások kimutatására, különös tekintettel a

beteg által nem észlelt, tünetmentes hipoglikémiákra és segít-e cukorbetegknél a jobb anyagcsere állapot elérésében.

3.2. A reaktív oxigén származékok (ROS) számos fiziológiás és patológiás folyamatban betöltött központi szerepük miatt az utóbbi időben a kutatók érdeklődésének középpontjába kerültek. Diabétes mellitusban a hiperglikémia kiváltotta szövődmények létrejöttében a fokozott oxidatív stressz központi szerepe feltételezhető. A diabéteszes mikro-, és makrovaszkuláris szövődmények kialakulásának alapját az endotél-diszfunkció képezi, melynek hátterében a hiperglikémia indukálta fokozott oxidatív stressz és az endoteliális nitrogén-monoxid (NO) termelés szekunder csökkenése áll. Hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) az emberi szervezetben számos biokémiai oxidációs folyamat melléktermékeként keletkezik. Egy viszonylag stabil ROS, mennyisége az emberi szervezetben néhány  $\mu\text{mol/l}$ -re tehető. Elektroaktív molekula, így mérésére amperometriás enzimelektrodokkal történő voltametriás méréseket is kifejlesztettek. Vizsgálatunk célja egy, a mindennapi gyakorlatban használt elektroenzimatikus 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 szérumban albumin (BSA) és humán plazmamintában, valamint egészséges és diabéteszes patkányban terveztük a  $H_2O_2$  szint *in vivo* mérését.

3.3. A dohányzás okozta endotél-diszfunkció patomechanizmusának kutatása a Pécsi II. sz. Belgyógyászati Klinikán hosszú múltra tekinthet vissza. A dohányfüst nagy mennyiségű szabad gyök, prooxidáns és aldehid tartalma révén okoz endotélsejt károsodást. Régóta ismert, hogy a dohányzás a NO termelésének és biológiai hozzáférhetőségének csökkentése révén vezet az endotélfüggő vazodilatáció károsodásához, melynek pontos mechanizmusa ismeretlen volt. Ma már ismert tény, hogy a cigarettafüst az L-arginin-eNOS-NO-cGMP jelátviteli útvonal befolyásolása útján okoz endotél-diszfunkciót. 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. A szabályozás egy rendkívül összetett, számos protein-kináz és protein-foszfatáz működését involváló folyamat. Az intracelluláris redox homeosztázis fenntartásában a glutation rendszer (GSH/GSSG) központi szerepe jól ismert.

Kísérleteink célja a cigarettafüst akut hatásának in vitro vizsgálata volt endotélsejteken. Kísérleteink során a cigarettafüstnek az eNOS enzim aktiváló és gátló foszforilációjára kifejtett hatását terveztük vizsgálni. További kísérleteinkkel az antioxidáns hatású GSH-nak az eNOS enzim működésére kifejtett pozitív, védő hatását kívántuk igazolni.

3.4. A végtagi gangrénák hátterében ritkán előforduló, potenciálisan életveszélyes klinikai entitás a kalcifilaxis. Leggyakrabban urémiás és/vagy hiperparatireózikus betegeknél alakul ki, azonban az utóbbi időben egyre gyakrabban mutatható ki normál vesefunkció és mellékpajzsmirigy működés mellett is, az entitást nem urémiás calcifilaxisnak (non uremic calciphylaxis, NUC) nevezzük. Újabb adatok szerint kialakulásában szerepet játszhat a hipofetuinémia. A kórkép lényege a kis és középnyag artériák tunika médiájának és a kötőszövetnek a kalcifikációja és az intima proliferációja, melynek következménye szöveti iszkémia és nekrózis kialakulása. Esetbemutatásunkkal az irodalomban elsőként tettünk említést hasnyálmirigy-vese transzplantáció után, a diabétesz és az urémia klinikai remissziójának fázisában kalcifilaxis megjelenéséről.

## 4. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A Pécsi II. számú Belgyógyászati Klinikán 2003. februárjától a Lilly Hungária Kft. által támogatott országos klinikai vizsgálat keretében inzulinkezelt cukorbetegéknél végeztünk 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:  $170 \pm 2$  cm; testtömeg-index (BMI):  $24,5 \pm 0,6$  kg/m<sup>2</sup>; szisztolés vérnyomás:  $123 \pm 2$  Hgmm; diasztolés vérnyomás:  $74 \pm 2$  Hgmm; hemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>):  $8,44 \pm 0,34$  %; fruktózamin (frukt):  $388 \pm 15$   $\mu$ mol/l; össz-inzulindózis:  $49 \pm 3$  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 két mérés eredményeit összehasonlítva vizsgáltuk az elvégzett terápiamódosítás szénhidrát-anyagcserét befolyásoló hatását.

4.2. Kísérleteinkhez a MiniMed Medtronic CGMS készülékéhez tartozó elektroenzimátikus glükóz-szenzort használtuk. A tű alakú szenzor az intersticiális glükóz enzimátikus bontása során keletkező, a glükózzal arányos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t detektálja. A szenzor az amperometriás detektáláshoz szükséges mindhárom elektródot (munka-, ellen-, és referencia elektród) tartalmazza, felépítéséről és készítésének technológiai háttéréről pontos információval nem rendelkezünk. Voltametriás méréseink során a szenzorhoz kapcsolódó CGMS készüléket egy elektrokémiai mérőállomással helyettesítettük. A szenzor és a mérőállomás közti kapcsolatot speciális, saját készítésű „összeköttetéssel” oldottuk meg. A szenzor glükóz-oxidáz enzimét foszfát puffer (PBS) oldatban oldott 5-szulfoszalicilsav-2-hidráttal (SSA) inaktiváltuk és további kísérleteink során az így létrehozott „inaktivált” H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szenzor alkalmazhatóságát vizsgáltuk. Voltametriás méréseinket folyamatos keverés alatt álló PBS oldatban, marha szérum albumin (BSA) oldatban és humán plazma mintákban, valamint altatott Wistar patkányok szubkután zsírszövetében végeztük. Kísérleteinkhez 250-300g tömegű, három hónapos életkorú hím Wistar patkányokat alkalmaztunk. A kísérleti állatok

egy részét intraperitoneálisan beadott streptozotocinnal kezeltük ( $70\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ ) azon patkányokat, melyek vércukorszintje meghaladta a  $13 \text{ mM}$  koncentrációt, diabéteszesnek tekintettük. A patkányok altatását uretánnal végeztük.

4.3. Kísérleteinkhez egér endotelioma sejteket használtunk (LGC Promochem, Taddington, UK). A dohányfüstpuffert (DFP) munkacsoportunk korábbi kísérleteivel megegyező módon filteres cigaretta füstjének (Camel; R.J. Reynolds Tobacco) egy vákumcsőszivattyú segítségével Krebs pufferbe történő szívatásával állítottuk elő. A dohányfüst idő-, és koncentrációfüggő akut hatásának vizsgálatához a sejteket  $37 \text{ C}$ -on Krebs-pufferrel (kontroll) vagy dohányfüstpufferrel (DFP) inkubáltuk többféle koncentrációban (5-50%) és időintervallumokban (5-30 perc). További kísérleteink során antioxidáns előkezelést alkalmaztunk redukált glutationnal (GSH). Kísérleteink során Western blot analízist alkalmaztunk és az eNOS enzim DFP hatására létrejövő aktiváló (P-Ser(1177)-eNOS) és gátló (P-Thr(495)-eNOS) helyen történő foszforilációjának mértékét vizsgáltuk. A detektált fehérje mennyiségét minden esetben az eNOS fehérjére korrigáltuk és a kontrollhoz viszonyítottuk.

## 5. EREDMÉNYEK

5.1. Az első méréskor az összes betegre vonatkoztatva a CGMS által a teljes mérési periódusban mért cukorértékek átlaga  $8,3 \pm 1,8$  mmol/l, a betegek által ujjbegyből mért vércukorértékek átlaga 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<sub>1c</sub> szintje  $8,44 \pm 1,79$  %, frukt szintje  $388 \pm 79$   $\mu$ mol/l volt. A kétféle módszerrel mért cukorértékek és a hosszú távú szénhidrát-anyagszere paraméterek között minden esetben pozitív korrelációt találtunk ( $p < 0,05$ ). 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. A legtöbb betegnél szimptomás és aszimptomás hipoglikémiák egyaránt előfordultak. 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 betegeknél az első monitorozás eredményeit figyelembe véve a kezelést egyénre szabott módon módosítottuk. Huszonöt betegnél a kezelés CGMS monitorozás alapján végzett célzott módosítása után a HbA<sub>1c</sub> 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. 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 betegünkönél az anyagszere-állapot romlását észleltük.

5.2. Elsőként a CGMS szenzor glükóz-, és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-érzékenységet vizsgáltuk amperometriás módszerrel. Többszöri azonos mennyiségű glükóz és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadását követően az áramjel lineáris növekedést mutatott. A kalibrációs görbék alapján megállapítható volt, hogy a szenzor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szenzitivitása megközelítőleg négyszázszor nagyobb mint a glükóz-érzékenysége.

Ezt követően a szenzort 5%-os SSA oldatban 30 percig inaktívtá tettük. Amperometriás mérésekkel igazoltuk, hogy az enzim inaktivációját követően a szenzor glükózra egyáltalán nem érzékeny. Aszkorbinsav hozzáadásakor sem volt detektálható áramjel-változás, amely az inaktívált szenzor változatlanul kiváló H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szelektivitását igazolta. Ugyanakkor az enzim-inaktiváció a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-érzékenységet nem befolyásolta. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mérés alsó méréshatára megközelítőleg 5  $\mu$ M volt. Vizsgáltuk az inaktívált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szenzor megbízhatóságát, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



mérési eredmények reprodukálhatóságát. „Recovery” vizsgálatunkban a létrehozott szenzor jól reprodukálható mérési eredményeket mutatott. További kísérleteink során az általunk létrehozott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szenzor működését ismert antioxidáns kapacitású biológiai mintákban vizsgáltuk. 35g/l koncentrációjú BSA-t tartalmazó oldatba azonos mennyiségű H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> többszöri hozzáadását követően az áramjel minden hozzáadásnál azonos mértékben növekedett, de a detektált áramjel-emelkedés kisebb mértékű volt az egyszerű PBS oldatban észlelnél. A fenti kísérletet humán plazmával megismételve átmeneti áramjel csúcsok voltak detektálhatók, melyek gyors lecsengése a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gyors lebomlására utalt. A nagyobb koncentrációjú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oldat hozzáadása magasabb áramjel csúcsot eredményezett, bár humán plazmamintában a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oldat hozzáadásakor keletkező áramjel jóval kisebb volt a BSA oldatban mért értékeknél. Végül a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szenzort diabéteszes és egészséges patkányok hasbőrére 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szintek között nem volt szignifikáns különbség, a detektált áramjel igen kicsi volt és folyamatos csökkenést mutatott.

5.3. A DFP koncentráció-, és időfüggően növelte az eNOS enzim foszforilációját mind a Ser(1177) mind a Thr(495) oldalláncokon. A legerősebb foszforilációs válasz 50%-os dohányfüst pufferral 20 percig történő kezelés hatására jelentkezett. A Thr(495) oldallánc foszforilációja minden esetben szignifikánsan nagyobb volt a Ser(1177) oldallánc foszforilációjánál. 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.

## 6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a CGMS az ujjbegyi vércukormérésnél lényegesen pontosabban jelzi a cukorszint ingadozásait. Az irodalmi adatokkal megegyezően jó korrelációt találtunk a CGMS által mért intersticiális és az ujjbegyi cukorértékek között. Emellett a CGMS által mért cukorszintek átlaga és a hosszabb távú szénhidrát-anyagcsere paraméterek ( $HbA_{1c}$ , frukt) között is pozitív korreláció állt fenn. Az első mérés alkalmával igen jelentős volt a tünetmentes hipoglikémiák átlagos száma. Vizsgálataink megerősítették a CGMS alkalmazásának előnyeit a beteg által nem észlelt, tünetmentes, főként éjszakai hipoglikémiák kimutatásában. 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. Mindezt úgy értük el, hogy a betegek inzulin dózisát és szénhidrát-bevitelét még kis mértékben csökkenteni is tudtuk, és testtömegük sem változott szignifikánsan. Eredményeink megerősítették, hogy a CGMS készülék alkalmazásával a hipoglikémiás epizódok gyakoriságának növelése nélkül jobb glikémiás kontroll érhető el diabéteszes betegeknél és a módszer kifejezetten alkalmas a tünetmentes hipoglikémiák kimutatására is. A CGMS egyértelműen nagy segítséget jelent a személyre szabott, individuális inzulinkezelés kialakításában és a betegek anyagcsere-állapotának javításában. Így a CGMS monitorozás alapján elvégzett terápia-módosítás hozzájárulhat a késői diabéteszes szövödmények 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.

6.2. 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. A  $H_2O_2$ -szint folyamatos monitorozása a tudományos kutatás és a klinikai gyakorlat számára egyaránt nagy jelentőséggel bírna. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a glükóz-szenzor  $H_2O_2$  -, és glükóz-érzékenysége között jelentős, nagyságrendi különbség van, a szenzor  $H_2O_2$ -re megközelítőleg négyszázszor érzékenyebb, mint glükózra. Kísérleteink alapján bizonyítást nyert, hogy az SSA-val végzett enzim-inaktiváció teljes volt, és a szenzor  $H_2O_2$ -vel szembeni szelektivitása változatlan maradt. A szenzor  $H_2O_2$ -vel szembeni érzékenysége az enzim-inaktiváció során szintén nem változott. További amperometriás méréseink alapján kimondhatjuk, hogy az általunk létrehozott  $H_2O_2$ -szenzor jól reprodukálható mérési

eredmények alapján pontos és megbízható  $H_2O_2$ -detektálást tesz lehetővé. A  $H_2O_2$ -mérés alsó méréshatára nagyságrendileg megegyezik a  $H_2O_2$  emberi szervezetben előforduló mennyiségével.

Az ismert szabadgyökfogó BSA-oldatban végzett méréseink során észlelt kisebb  $H_2O_2$ -érzékenység háttérében a BSA-oldat antioxidáns kapacitása és nagyobb viszkozitása állhat. Humán plazmamintákban végzett amperometriás méréseink során a  $H_2O_2$ -oldat hozzáadásakor látható meglepően gyorsan lecsengő „spike”-jellegű áramjelek pedig a plazma összetett, hatékony antioxidáns működésének következményei lehetnek. Az elektroenzimátikus glükóz-szenzorok in vivo megfigyelhető lassú szenzitivitás-csökkenésének háttérében a szenzor felszínén végbemenő fibrin depozíció állhat. A szenzitivitás-csökkenés ellenére a glükózmérés megbízhatóságát az állandó külső kalibráció biztosítja, azonban az in vivo  $H_2O_2$ -mérés eddigi sikertelenségét ez részben magyarázhatja. Eredményeink 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 tervezünk, melyek a szenzor in vivo alkalmazhatóságáról fognak részletes adatokkal szolgálni. Reményeink szerint további átalakításokat követően 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.

6.3. Az endotél-diszfunkció számos kardiovaszkuláris betegség – hipertónia, ateroszklerózis, diabétesz mellitusz, krónikus vesebetegség – indikátora. Az endotélsejtek megváltozott működésének következménye a NO termelésének és biológiai hozzáférhetőségének csökkenése, ami az endotélfüggő vazodilatáció károsodásához vezet. A dohányfüst endotél-diszfunkciót okozó hatása régóta ismert. A dohányzás összetett hatása révén mind a makro-, mind a mikrovaskuláris endotél károsítja. A dohányfüst endotél-diszfunkciót okozó hatásában az eNOS enzim működésének befolyásolása és ezáltal az NO biológiai hozzáférhetőségének megváltozása központi szerepet játszik, melynek pontos patomechanizmusa ezidáig ismeretlen volt.

Kísérleteink során a dohányzásnak az eNOS enzim poszttranszlációs szabályozására kifejtett hatásait vizsgáltuk egér endotélsejteken. Elsőként sikerült igazolnunk, hogy DFP kezelés hatására az aktiváló/gátló foszforiláció arányának gátló irányba történő eltolódása vezet az eNOS aktivitásának és következményesen a NO biológiai hozzáférhetőségének

csökkenéséhez. Ismert, hogy a dohányfüst kátránytartalma mellett számos káros hatású prooxidáns, szabadgyököt és aldehideket tartalmaz, melyek erőteljes oxidatív hatást fejtenek ki. A GSH/GSSG az egyik legfontosabb celluláris redox puffer rendszer, mely optimális intracelluláris redox környezetet biztosít a makromolekulák megfelelő működéséhez. Az eNOS foszforilációs szabályozásának GSH hatására aktiváló irányba történő eltolódása az eNOS fokozott aktivitásához és az endotélfunkció javulásához vezet. A GSH feltehetően a dohányfüstben található aldehidek megkötése révén fejt ki pozitív hatását az eNOS működésére. Mindezek alapján 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. 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. A GSH védő szerepének igazolása a dohányfüstben található aldehideknek az endotél-diszfunkció kiváltásában betöltött patogenetikai szerepét támasztja alá.

6.4. 50 éves betegüknél sikeres hasnyálmirigy-vese transzplantációt követően fél évvel után gangrénák akrális megjelenését tapasztaltuk. Ezt megelőzően a betegnek 45 éve ismert volt 1-es típusú diabétesz mellitusza. A gangrénák kialakulásakor, a transzplantáció után 6 hónappal a beteg vesefunkciós értékei és vércukorszintje normál tartományban volt, ezért dialízisre és inzulinkezelésre nem szorult. A szérum kalcium, foszfát és parathormon szintje is normál tartományban volt. Ugyanakkor a beteg szérum fetuin szintje alacsony volt, az inzulin szenzitivitása pedig emelkedettnek bizonyult. Valószínűleg ezek a tényezők szerepet játszhattak a kalcifilaxis patogenezisében, illetve tüneteinek kiváltásában és súlyosbításában. Keringésjavító infúziós kezelések és a szteroid dózisának emelése javulást eredményezett. Esetünkkel szeretnénk felhívni a figyelmet arra, hogy kalcifilaxis okozta gangrénák kialakulására korábban diabéteszes és urémiás betegeknél a látszólagos klinikai remisszió fázisában is számítani lehet.

## 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 terápiamódosítás javítja a glikémiás státuszt és hozzájárulhat a késői diabéteszes szövödmények gyakoriságának csökkentéséhez is.

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

**2/2** Az általunk létrehozott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szennorral a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mérés alsó méréshatára 5 μmol/l körüli.

**2/3** BSA és humán plazmamintákban végzett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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. 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<sup>\*</sup>, B. Laczy<sup>\*</sup>, **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 betegeknél. 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 János dr., Wagner László dr., Wagner Zoltán dr., Nagy Judit dr., Wittmann István dr.: Folyamatos cukormonitorozással (CGMS) javítható a glykaemia diabeteses 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: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

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

## **2. PhD értekezéshez nem kapcsolódó publikációk**

### **Idézhető konferencia absztraktok**

#### **Angol nyelven**

**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**)

#### **Magyar nyelven**

**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 lévő laktát dehidrogenáz aktivitás prediktív értéke nephrosis-szindrómában. Hypertonia és Nephrologia 2005; 9(S4): 71.)

**Tamaskó M.**, Kalmár Nagy K., Pótv 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.

### **Egyéb, nem idézhető tudományos előadások és poszterek**

**Tamaskó M**, Kalmár NK, Pótv 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.



## 9. 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 példaképpemmé 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 alaposágra 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 szüleim és nagymamám mindig támogató, megértő szeretetét, férjem segítségét és türelmét, valamint tágabb családom és barátaim támogatását.