

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A 2-es típusú cukorbetegség, a krónikus vesebetegség és öregedés
krónikus komplikációinak patogenezeise. Az oxidatív stressz,
az endotéldiszfunkció és a renin-angiotenzin-rendszer szerepe**

dr. Molnár Gergő Attila

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
II. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum
Pécs**

2007

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

<i>ACE</i> , angiotenzin konvertáló enzim	<i>GSH</i> , redukált glutation
<i>ADMA</i> , aszimmetrikus dimetilarginin	<i>H₂O₂</i> , hidrogén peroxid
<i>AGE</i> , advanced glycation end products, előrehaladott glikációs végtermékek	<i>Hb A_{1c}</i> , hemoglobin A _{1c}
<i>ATP</i> , adenzin trifoszfát	<i>HPLC</i> , nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
<i>CBB</i> , Coomassie brillantkék	<i>L-NMMA</i> , L-N-monometilarginin
<i>CKD</i> , chronic kidney disease, krónikus vesebetegség	<i>m-Tyr</i> , meta-tirozin
<i>CONTR</i> , kontrollcsoport	<i>non-DM CAT</i> , cataractás, nem diabéteszes betegek csoportja
<i>DM</i> , diabétesz mellitusz	$\cdot O_2^-$, superoxid szabad gyök
<i>DM CAT</i> , cataractás, 2-es típusú cukorbetegség csoportja	$\cdot OH$, hidroxil szabad gyök
<i>DOPA</i> , 3-,4-dihidroxi-fenilalanin	<i>OS</i> , oxidatív stressz
<i>EDTA</i> , etiléndiamin-tetraacetát	<i>o-Tyr</i> , orto-tirozin
<i>eNOS</i> , endotheliális nitrogen monoxid szintáz	<i>p-Tyr</i> , para-tirozin
<i>Fe²⁺</i> , ferro vas, Fe(II)	<i>PAGE</i> , poliakrilamid gélelektroforézis
<i>Fe³⁺</i> , ferri vas, Fe(III)	<i>PCR</i> , polimeráz láncreakció
<i>Fe(NH₄)(SO₄)₂</i> , ferri-ammónium-szulfát	<i>Phe</i> , fenilalanin
<i>Fex</i> , frakcionált exkréción	<i>RAGE</i> , AGE receptor
<i>γ-GT</i> , γ-glutamil transzferáz	<i>SD</i> , standard deviáció
<i>GPX</i> , glutation peroxidáz	<i>SDS</i> , nátrium dodecilszulfát
	<i>SDMA</i> , szimmetrikus dimetilarginin
	<i>SOD</i> , szuperoxid dizmutáz

1. BEVEZETÉS

A 2-es típusú diabetes mellitus (DM), a krónikus vesebetegség (chronic kidney disease, CKD) és az öregedés szövődményeinek patogeneziise multifaktoriális; környezeti tényezőket, gyulladási folyamatokat, előnytelen genetikai háttérrel, anyagcsere-zavarokat, szabad gyökös folyamatokat stb. foglal magába. Az alábbiakban ezek közül kerül néhány faktor felsorolásra.

1.1. Oxidatív stressz

Az oxidatív stressz (OS) a szabad gyökök és antioxidánsok közötti egyensúly felborulását jelenti, mely lehet fokozott gyöktermelés és/vagy csökkent antioxidáns kapacitás következménye. Az OS-nek fontos szerepet tulajdonítunk a DM és CKD szövődményeinek kialakulásában. A szabad gyökök/reaktív oxigén származékok (szuperoxid anion gyök [$\cdot\text{O}_2^-$], hidrogén peroxid [H_2O_2], hidroxil szabad gyök [$\cdot\text{OH}$] stb.) és az antioxidáns rendszerek közötti eltolódás szabad gyökös károsodást hozhat létre. Fém-katalizált oxidációs reakciók – mint a Fenton-reakció, ahol a hidrogén peroxid $\cdot\text{OH}$ -re és hidroxil anionra hasad – fontos szerepet játszanak az OS kialakulásában.

DM-ben a magas glükózkoncentráció OS-t hoz létre többek között a károsodott metabolizmus, a poliol-anyagcsereút, és nem-enzimatikus glikációs reakciók révén. Nem DM-es egyénekben az öregedés kapcsán képződő szabad gyökök hozzájárulhatnak a korfüggő fehérjekárosodások kialakulásához.

Vesebetegségekben sokféle okból kifolyólag lehet jelen fokozott OS, így pl. a vesebetegség háttérében álló gyulladási folyamatok is hozzájárulhatnak. Gyakran megfigyelhető a renin-angiotenzin rendszer fokozott aktivitása az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) magas aktivitásával. A glomeruláris filtráció beszűkülése kismólsúlyú molekulák, így előrehaladott glikációs végtermékek (AGE), pro-inflammatorikus

citokinek (IL-1, IL-6 és TNF- α) felszaporodását okozza. Az AGE és AGE receptor (RAGE) kapcsolat és a citokinek gyulladós sejteket aktiválnak, ami légzési robbanáshoz, szabad gyökök és kemoattraktánsok képződéséhez vezet. A hemodialízis is hozzájárul a fokozott OS-hez.

1.1.1. A vas szerepe

A klasszikus Fenton-reakcióban a H₂O₂ hasítását a ferro vas redox átalakulása katalizálja. A Fenton-szerű reakciók kivédésére, a vas általában vas-fehérje komplexek (pl. transzferrin, ferritin) formájában tárolódik. A nem fehérjéhez kötött vasat más anyagok, így citrát, szerves foszfátok is komplexálhatják. Ezek a kelátorok fokozhatják, vagy csökkenthetik a vas redox-aktivitását.

1.1.2. Antioxidáns enzimek

A citoszólikus Cu/Zn szuperoxid dizmutáz (SOD) és a mitokondriális Mn-SOD átalakítja a $\cdot\text{O}_2^-$ -t H₂O₂-vé. A kataláz enzim a reaktív H₂O₂-t alakítja tovább biológiailag inert vízzé. A peroxidáz enzimek egyike a glutation-peroxidáz (GPX), egy 80 kDa-os, szelén tartalmú enzim, mely redukált glutationt (GSH) használ a H₂O₂ redukálásához. A gamma-glutamil transzferáz enzim (γ -GT) segíti az extracelluláris GSH felhasználását azáltal, hogy a GSH-t aminosavakra bontva átviszi a membránon, ahol a GSH újraképződhet.

1.1.3. A fenilalanin átalakulási reakciói

Az aromás oldalláncú aminosavak érzékenyek az OS-re, oxidációs termékeik stabilak. Az esszenciális aminosav fenilalanin (Phe) a fenilalanin hidroxiláz reakcióban fiziológias, szemi-esszenciális para-tirozinná (p-Tyr) alakul. Ebben a reakcióban más Tyr izomer nem képződik. Azonban $\cdot\text{OH}$ hatására a Phe para, meta és orto helyzetben is hidroxilálódhat, így para-, meta- és orto-tirozin (p-, m-, o-Tyr) is képződik a szabad gyökös reakcióban. Egy

további enzimatis vagy szabad gyökös reakcióban a p-Tyr-ból 3,4-dihidroxi-fenilalanin (DOPA) képződhet, mely további szabad gyökök hatására le is bomolhat DOPA-kinonokká.

1.1.4. Az L-arginin analógok hatásai

A metilált L-arginin analógok, így az L-N-monometilarginin (L-NMMA) és az asszimétrikus dimetilarginin (ADMA) az endotheliális nitrogén monoxid szintáz enzim (eNOS) kompetitív gátlószerei, melyek gyulladásoos sejtek endothelhez való kitapadását, a trombociták fokozott aggregációját és adhézióját, vagyis endotél-diszfunkciót okozhatnak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A Phe-Tyr átalakulás *in vitro* tanulmányozása^{I,II}

- Célunk volt a Phe-Tyr átalakulás *in vitro* vizsgálata ferri vasat és hidrogén peroxidot tartalmazó hidroxil szabad gyök-keltő rendszerben;
- a vas redox ciklusa szerepének tanulmányozása a konverziós reakcióban;
- az egyes, az *in vitro* Phe-Tyr konverzióban termelődő Tyr izomerek (p-, m- és o-Tyr) mennyiségének meghatározása;
- a vas kelátorok és a pH hatásának kimutatása a p-, m- és o-Tyr termelődésre.

2.2. Klinikai vizsgálat 2-es típusú diabéteszes betegekben és/vagy krónikus vesebetegekben a p- és az o-Tyr vizelet és plazmaszintjének valamint renális kiválasztásának meghatározására^{III}

- Célunk volt a p-, m-, o-Tyr és Phe koncentrációjának kontroll személyek, 2-es típusú diabéteszes és/vagy krónikus vesebetegek vizelet és plazma mintáiban való meghatározása;
- egy lipidperoxidációs marker, a 8-epi-prostaglandin-F_{2α} és a hidroxil szabad gyök marker o-Tyr vizelet szintjei közötti korreláció vizsgálata;
- a fiziológiásan képződő és a hidroxil szabad gyök hatására létrejövő Tyr izomerek vesében történő anyagcseréjének tanulmányozása.

2.3. Klinikai tanulmány cataractás 2-es típusú cukorbeteg és nem cukorbeteg lencsemintáinak vizsgálatára^{IV}

- Célunk volt nem-cataractás lencsék, 2-es típusú cukorbeteg és nem cukorbeteg cataractás lencsei fehérjeösszetételének vizsgálata;
- a cataractás és nem cataractás lencsék teljes homogenátuma és vízdékony frakciója fehérjetartalmának összehasonlítása;
- a teljes lencsehomogenátumok és a vízdékony frakciók fehérjeösszetételének összehasonlítása;
- a teljes lencsehomogenátumokban és a vízdékony frakciókban a Phe oxidatív poszt-transzlációs módosulási markereinek (m-, o-Tyr és DOPA) meghatározása;
- a teljes lencsehomogenátumokban és a vízdékony frakciókban a Phe tartalom mérése.

2.4. Klinikai tanulmány az ACE gén-polimorfizmus és a klinikai paraméterek közötti kapcsolat vizsgálatára 2-es típusú diabéteszes betegekben^{V,VII,VIII}

- Célunk volt az ACE gén I/D polimorfizmusa, a szénhidrát anyagcsere, a célszervkárosodás és más klinikai paraméterek közötti lehetséges kapcsolat kimutatása;
- az ACE gátlók szedése és glikémiás paraméterek közötti kapcsolat vizsgálata 2-es típusú diabéteszesekben.

2.5. Klinikai tanulmány a glutation peroxidáz enzim génpolimorfizmusának és az L-arginin analógok szintjének tanulmányozására^{VI}

- Célunk volt az L-NMMA, ADMA és SDMA szérumban szintjének meghatározása különböző glutation peroxidáz genotípusú 2-es típusú diabéteszes betegcsoportokban.

3. MÓDSZEREK

3.1. *In vitro* Phe-Tyr átalakulás tanulmányozása egy Fenton-szerű fémkatalizált oxidációs reakcióban

Spektrofotometriás módszer: Az *in vitro* Tyr termelődés kimutatása egy Hitachi F-4500 spektrofotométerben (Hitachi Inc, Tokyo, Japán) történt, 275 nm-es excitációs, 305 nm-es emissziós hullámhosszok és 10 nm-es excitációs és emissziós résszélesség mellett. A felhasznált anyagok és koncentrációik az alábbiak voltak: Phe, 100 µmol/l és 1 mmol/l; dezferrioxamin, 2 mmol/l; H₂O₂ 1 mmol/l; ferri-ammonium-sulfate [Fe(NH₄)(SO₄)₂] 25, 50, és 100 µmol/l; etilén-diamin-tetraacetát (EDTA), 1 mmol/l; citromsav, 1 mmol/l.

$\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ -t használtuk ferri vas forrásként, így a továbbiakban erre vonatkozik a ferri vas megnevezés. Terveztük még az adenzin trifoszfát (ATP) keláló hatásának vizsgálatát a reakcióban, azonban az ATP saját fluoreszcenciája zavarta a spektrometriás mérést. A szuperoxid szabad gyök termelődésének és a Phe-Tyr átalakulásban való lehetséges szerepének vizsgálatára szuperoxid dizmutázt (SOD, 0.8-100 U/ml) használtunk, és hő-inaktivált (95 °C, 50 perc, 100 U/ml) SOD-ot is vizsgáltunk.

HPLC módszer: A HPLC méréseket a fenti vizsgálati mintákból végeztük. A mérés egy RF-10 A_{XL} fluoreszcens detektorral felszerelt Shimadzu Class LC-10 AD_{VP} HPLC rendszeren, Licrospher C-18 ODS oszlopon, izokratikus körülmények között, 1 % ecetsavat és 1 % Na-acetátot tartalmazó vizes alapú mobilfázisban, a fenti hullámhosszokon történt.

3.2. Klinikai vizsgálat 2-es típusú diabéteszes betegekben és/vagy krónikus vesebetegekben a p- és o-Tyr vizelet és plazmaszintjének valamint renális kiválasztásának meghatározására^{III}

Valamennyi alább felsorolt klinikai vizsgálat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kara Helyi Etikai Bizottságának engedélyével történt.

Egy keresztmetszeti vizsgálatban négy betegcsoportot vizsgáltunk: (1) nem diabéteszes, nem vesebeteg kontroll személyek csoportja (CONTR, n = 14), (2) III-as stádiumú krónikus vesebetegek csoportja (chronic kidney disease, CKD, n = 12), (3) 2-es típusú diabéteszes betegek csoportja (DIAB, n = 17), és (4) 2-es típusú diabéteszes és III-as stádiumú krónikus vesebetegségben is szenvedő betegek csoportja (DIAB-CKD, n = 19). A csoportok között nem volt szignifikáns különbség nemben és korban. A CKD és DIAB-CKD csoportok között nem volt szignifikáns különbség a vesefunkciókárosodásban. A DIAB és a DIAB-CKD csoportok között nem volt különbség a fruktózamin és hemoglobin A_{1c} szintek között. Nem volt szignifikáns különbség a csoportok májfunkciós paraméterei és vérsír szintjei között. Huszonnégy órás gyűjtött vizelet és heparinos plazma mintákat

gyűjtöttünk a betegektől, emellett rutin klinikai paraméterek is meghatározásra kerültek. Triklórecetsavval fehérjementesített friss heparinos plazmát és 24-órás gyűjtött vizeletet használtunk a HPLC-s mérésekhez. A HPLC mérés a korábbi körülményeknek megfelelően történt. A vizelet 8-epi-prostaglandin- $F_{2\alpha}$ szintek egy kompetitív ELISA kit (Oxis) segítségével kerültek meghatározásra.

3.3. Klinikai tanulmány cataractás 2-es típusú cukorbetegék és nem cukorbetegék lencsemintáinak vizsgálatára^{IV}

Egy keresztmetszeti vizsgálatban extracapszuláris cataractaműtét során eltávolított lencsét vizsgáltunk. Kontrollként corneatranszplantáció céljából enukleált kadáver-szemek lencsési szolgáltak. Három csoportot formáltunk, (1) nem diabéteszes, nem cataractás kontrollok (CONTR); (2) cataractás és 2-es típusú diabéteszes betegek (DM CAT); és (3) cataractás nem diabéteszes betegek csoportja (non-DM CAT). Nem volt különbség korban a CONTR és a DM CAT csoportok között, azonban a non-DM CAT csoport betegei szignifikánsan idősebbek voltak mind a CONTR mind a DM CAT csoporthoz képest.

Valamennyi cataractás lencsét ugyanaz a szemész, ugyanazon körülmények között távolította el, fakoemulzifikációs technikával. A vízdékony és vízben nem oldékony lencsekomponensek elválasztása centrifugálással (13.000 rpm, 30 min) történt. A vízdékony fehérjefrakciót a totál lencsehomogenátumok centrifugálás utáni felülúszójaként nyertük. Ugyanazon mintákat használtuk a fehérjemegoszlás vizsgálatához, a fehérjeelektroforézishez és a HPLC mérésekhez. A teljes homogenátumok és a felülúszók fehérjetartalmát Bradford szerinti méréssel határoztuk meg.

Egy 12,5%-os gélben SDS-poliacrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) egy Mini Protean 3 készülékben történt a fehérjék szétválasztása. Kismólsúlyú fehérjéket használtunk markerként. A gél Willoughby szerinti ezüstözésre került a klasszikus Coomassie brillantkék R-250 (CBB) festést követően. A HPLC méréshez a mintákat dezferrioxamin és butilált

hidroxitoluén jelenlétében (az artefakt oxidációs kivédő antioxidánsok) egy éjszakán át 120 °C-on 12 N-os sósavval hidrolizáltuk. A hidrolizátumot szűrtük, majd a HPLC oszlopra injektáltuk. A futtatás a fenti körülmények között történt. Az aminosavkoncentrációkat a minták fehérjetartalmára vagy Phe tartalmára korrigáltuk.

3.4. Klinikai tanulmány az ACE gén-polimorfizmus és klinikai paraméterek közötti kapcsolat vizsgálatára 2-es típusú diabéteszes betegekben^V

Ebben a klinikai tanulmányban 2-es típusú diabéteszes betegeket (n = 145) vizsgáltunk. Az ACE gén-polimorfizmus érzékenyített touchdown polimeráz láncreakció (PCR) segítségével perifériás vérből kisózással előállított DNS-mintából került megállapításra. A plazma glükóz, HbA_{1c}, szérum fruktózamin, összkoleszterin, triglicerid, HDL és LDL koleszterin, γ -GT aktivitás, kreatinin, karbamid nitrogén, szérum bilirubin és az albuminuria meghatározása standard laboratóriumi módszerekkel történt.

3.5. Klinikai tanulmány L-arginin analógok szintjének tanulmányozására különböző glutation peroxidáz genotípusú 2-es típusú diabéteszes betegekben^{VI}

A vizsgált DNS szekvencia amplifikálását követően egy egy-nukleotid polimorfizmus kimutatása történt egy ABI PRISM SNaPshot Multiplex készülékkel (Applied Biosystems). A plazma minták szulfoszalicilsavas fehérje-mentesítése után az aminosavakat orto-ftálaldehiddel és merkaptóetanollal tettük fluoreszkálóvá, a reakciót ortofoszforsavval állítottuk le. A meghatározás egy Yamamura C₁₈ ODS HPLC oszlopon a Shimadzu HPLC készüléken történt, egy gradiens futtatásban. Az eluensek egy 10 mmol/l kálium-foszfát puffer + 10 % acetonitril oldat és egy 40 % acetonitril + 30 % metanol oldat voltak. Az aminosavakat 350 nm-es excitációs és 450 nm-es emissziós hullámhosszokon mértük fluoreszcens detektorral.

3.6. Statisztikai analízis

Valemennyi tanulmány esetén megvizsgáltuk az adatok eloszlásának normalitását. Normál eloszlású adatok esetén az adatokat átlag +/- standard deviáció alakban adtuk meg, vizsgálatukra paraméteres tesztek (ANOVA, Student t-próba, Pearson korreláció) használtunk. A nem normál eloszlású adatok eloszlását medián és interquartilis tartománnyal jellemeztük, és nem paraméteres tesztek (Kruskal-Wallis teszt, Mann-Whitney u-teszt, nem paraméteres korrelációk) használtunk. A tesztek az SPSS szoftver segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A Phe-Tyr átalakulás *in vitro* tanulmányozása egy Fenton-szerű fém-katalizált oxidációs reakcióban (I-II. közlemény)

A spektrofluorimetriás módszer alkalmas volt az *in vitro* rendszerben képződő Tyr kimutatására. H₂O₂ hozzáadása a Phe-hoz Tyr termelődéshez vezetett, de a fluoreszcencia-növekedés vas hiányában nem volt szignifikáns. Növekvő koncentrációjú ferri vas koncentrációfüggően fokozta a Tyr képződést, ez a növekedés kivédhető volt a vas redox ciklusát gátló dezferrioxaminnal történő előinkubálással. Ez a tény azt jelzi, hogy a vas redox-ciklusa szükséges a Tyr termelődéshez.

A vas-kelátorok és a pH hatása: Az EDTA használata a Tyr-fluoreszcencia lassú, időfüggő növekedését hozta létre. Citrát jelenlétében a korai fázisban egy gyorsabb emelkedés, a második fázisban egy lassú emelkedés volt megfigyelhető. A citrát H₂O₂ hiányában is létre tudott hozni Tyr képződést, feltehetőleg autoxidációja révén.

A citrátos és EDTA-s kísérleteket megismételtük egy Sørensen foszfátpuffer (pH 7.4) használatával is. A foszfátpuffer jelenlétében alacsonyabb Tyr képződést láttunk a Phe-Fe-EDTA-H₂O₂ és Phe-Fe-citrát-H₂O₂ rendszerekben, valamint a Phe-Fe-citrát rendszerben is.

A SOD hatása: SOD hozzáadása a Tyr termelődést koncentrációfüggően csökkentette. A SOD 50 perces főzése (95 °C-on) kivédte a SOD gátlóhatását, és a Tyr

termelődés a SOD nélküli rendszerhez volt hasonló. Ez arra utal, hogy a reakció magában foglalja a $\cdot\text{O}_2^-$ jelenlétét is.

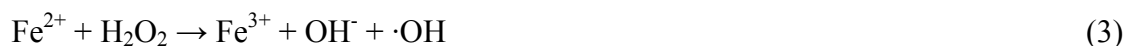
4.2. *In vitro* para-, meta- és orto-tirozin termelődés hidroxil szabad gyök hatására. HPLC vizsgálat. (I-II. közlemények)

A hidroxil szabad gyököt termelő rendszer jelenlétében jól kimutatható mennyiségű p-, m- és o-Tyr termelődött. A m-Tyr képződése volt a legmagasabb, a p-Tyr-é a legalacsonyabb. A termelődött Tyr izomerek mennyisége 300 és 500 nmol/l közötti tartományban volt. Dezferrioxamin hozzáadása szignifikánsan csökkentette a p-, m- és o-Tyr termelődést. A Phe esetén nem volt szignifikáns változás kimutatható. A megfigyelés, miszerint a Phe szintek nem változtak szignifikánsan, feltehetőleg annak a következménye, hogy a Phe-Tyr átalakulás aránya csak kb. 1:10.000, vagyis a Phe feleslegben van jelen.

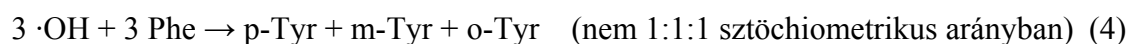
A vas-kelátorok és a pH hatása: H_2O_2 hiányában csak a Fe-citrát komplex vezetett jelentős Tyr termeléshez a kontroll állapothoz viszonyítva. A H_2O_2 -t tartalmazó reakcióelegyekben az ATP csökkentette, míg az EDTA és a citrát fokozta a p-, m- és o-Tyr termelést. Az eredmények hasonlóak a fluorimetriás adatokhoz, kivétel csupán a Phe+Fe+EDTA+ H_2O_2 rendszerben a szignifikancia hiánya. Irodalmi adatok alapján ez az EDTA-nak a Tyr fluorimetriás kimutatásával való interferenciájának következménye. Megerősíti ezt a feltevést az EDTA-s minták alacsony kiindulási Tyr-fluoreszcencia értéke is.

A foszfátpuffer jelenlétében a p-Tyr termelődés alacsonyabb volt a Phe-Fe-EDTA- H_2O_2 , a Phe-Fe-citrát- H_2O_2 és a Phe-Fe-citrát rendszerekben. H^+ ionok magas koncentrációja esetén a képződő OH^- ionok elbomlanak vízzé, így a Fenton reakció jobbra tolódik, és több $\cdot\text{OH}$ gyök termelődik, amit a foszfátpuffer gátol. A metabolikus zavarokban így pl. DM-ben is megfigyelhető magas citrát, alacsony ATP szintek és az acidózis irányába történő eltolódás hozzájárulhat a vassal összefüggő oxidatív károsodásokhoz. A citrát amiatt is érdekes, mert hiperglikémiában felszaporodhat, másrészt hemokromatózisos betegekben leírták vas-citrát

komplexek magasabb szintjét is. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a feltételezett reakciósor a következő:



A 3-as reakcióban képződő $\cdot\text{OH}$ kémiaailag módosíthatja a Phe-t:



4.3. A vizelet és plazma para- és orto-tirozin nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás kimutatásának és a vizelet 8-epi-prosztaglandin F_{2a} szintek méréseinek eredményei (III. közlemény)

Para-tirozin: Eredményeink szerint a CKD csoport plazma p-Tyr szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a CONTR és DIAB csoportokhoz képest. Hasonlóan, a DIAB-CKD csoport plazma p-Tyr szintje alacsonyabb volt a DIAB csoporthoz képest. Hasonó eredményeket kaptunk, ha az eredményeket a plazma Phe szintekre korrigáltuk. Az egyes csoportok között nem volt különbség a plazma Phe szintekben.

A vizeletben a p-Tyr mennyiségét korrigáltuk a vizelet kreatinin koncentrációkra. A vizelet kreatinin-koncentrációkban nem volt különbség a csoportok között. A CONTR csoport magasabb vizelet p-Tyr/kreatinin aránnyal rendelkezett, mint a CKD csoport. Hasonlóan, a DIAB csoportban magasabb volt a p-Tyr/kreatinin hányados, mint a CKD vagy a DIAB-CKD csoportokban. A napi p-Tyr ürítés alacsonyabb volt a CKD és DIAB-CKD csoportokban, mint a DIAB csoportban. A p-Tyr plazmaszintek és vizeletszintek jól korreláltak egymással.

A CKD és a DIAB-CKD csoportok p-Tyr clearance-e alacsonyabb volt, mint a DIAB csoporté. Nem találtunk viszont különbséget a betegcsoportok és a kontrollok összehasonlításakor. Hogy megvizsgáljuk a vesekárosodásnak a p-Tyr ürítésére gyakorolt

hatását, kiszámoltuk a p-Tyr frakcionált exkrécióját (Fex). Nem volt különbség a csoportok Fex értékei között.

Újabb irodalmi adatok szerint a veseelégtelenség csökkent renális fenilalanin-hidroxiláz enzim aktivitást okoz. Esetünkben valamennyi p-Tyr Fex érték 100 % alatt volt (a teljes tartomány az összes csoportra: 0,24 – 20,67 %), ami arra utal, hogy a p-Tyr-t a vese jól visszatartja. A csökkent p-Tyr szintézis és nem a fokozott veszteség mellett szól az is, hogy a CKD csoport alacsony plazma és vizelet p-Tyr szintje egy a CONTR csoporthoz hasonló Fex mellett jön létre.

Orto-tirozin: A CKD és DIAB-CKD csoportok plazma o-Tyr szintje magasabbnak tűnt a CONTR csoporthoz képest, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns. Hasonló eredményt kaptunk a szérum o-Tyr adatok szérum Phe szintekre való korrekciója esetén is. A vizelet o-Tyr/kreatinin aránya magasabb volt a három betegcsoportban, mint a CONTR csoportban, és magasabb volt a DIAB-CKD csoportban, mint a DIAB csoportban. Mindhárom betegcsoport napi o-Tyr ürítése szignifikánsan magasabb volt a CONTR csoporthoz képest. A két diabéteszes csoport napi o-Tyr ürítése magasabb volt a CKD csoporthoz képest is. A plazma és vizelet o-Tyr szintek között nem volt szignifikáns korreláció. Összesítve azt találtuk, hogy a diabétesz és a vesebetegség egymást erősítve fokozza az o-Tyr kiválasztását.

Az o-Tyr clearance tekintetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Azonban azt találtuk, hogy a DIAB és DIAB-CKD csoportok o-Tyr Fex értéke szignifikánsan magasabb volt a CONTR csoporthoz képest. Mindkét csoportban az o-Tyr Fex érték mediánja 100 % felett volt. Egy ilyen magas Fex érték két folyamat eredménye lehet, mégpedig vagy az adott anyag aktív tubuláris szekréciójának vagy az adott anyag *in loco*, a vesében történő termelődésének következménye lehet. Eredményeink alapján nem dönthető el, melyik jelenség a valószínűbb. Elképzelhető, hogy a magas glükózsintek okozta oxidatív stressznek

a tubuláris sejtekre gyakorolt hatásaként növekszik az o-Tyr termelődése és ezáltal Fex értéke a DIAB és DIAB-CKD csoportokban.

Az o-Tyr Fex értéke szignifikánsan magasabb a p-Tyr Fex értékénél már a kontroll csoportban is, ez arra utal, hogy a vese már a kontroll csoportban is sokkal (kb. 10x) hatékonyabban visszatartja a p-Tyr-t mint az o-Tyr-t. Vagyis a p- és o-Tyr vesében való kezelése jelentősen eltér annak ellenére, hogy a két aminosav között csak a hidroxil csoport helyzetében van különbség. Ez egy adaptív mechanizmus is lehet, hiszen a vese visszatartja a fiziológiás, míg kiüríti a patológiás izoformát.

8-epi-prostaglandin- $F_{2\alpha}$: A vizelet 8-epi-prostaglandin- $F_{2\alpha}$ /kreatin arány nem korrelált a plazma o-Tyr szintekkel, a plazma o-Tyr/Phe aránnyal, a vizelet o-Tyr/kreatinin aránnyal, a napi o-Tyr ürítéssel, az o-Tyr clearance-szel, sem az o-Tyr Fex-szel. A korreláció hiánya arra utal, hogy a két szabad gyök marker máshonnan származik.

4.4. A cataractás humán lencsék vizsgálatának eredményei (IV. közlemény)

Fehérjemegoszlás: Azt találtuk, hogy a cataractás mintákban a vízdékony frakciónak a teljes minta fehérjetartalmához viszonyított fehérjetartama alacsonyabb a kontroll mintákéhoz képest. Ez arra utal, hogy a vízdékony és a nem-vízdékony fázisok közötti fehérjemegoszlás eltérő cataractás és nem-cataractás lencsékben. Nem volt különbség a DM CAT és a non-DM CAT csoportok között, ami arra utal, hogy mindkét csoportban a fehérjék vízdoldhatatlanná válása jellemző a cataractára.

ELFO vizsgálat: Mindegyik mintában több sáv is látható volt a 20-30 kDa-os tartományban (ahol a lencse krisztallin fehérjéi is megtalálhatók). A cataractás lencsékben a sávok mintázata azonban eltérő volt, ugyanis megjelent két újabb sáv is, melyek a kontroll mintákban vagy nem voltak egyáltalán jelen, vagy lényegesen kisebb volt intenzitásuk. Ez arra utal, hogy a cataractás és nem-cataractás lencsék kismólsúlyú fehérjéinek összetétele

különböző. Ezen kívül említésre méltó még, hogy valamennyi totál homogenátum esetén a gyűjtőgélben nagymólsúlyú aggregátumoknak megfelelő festést kaptunk, melyek felelősek lehetnek a csökkent lencsetranszparenciáért, és jelezhetik a lencsefehérjék oldhatatlanná válását, amit a fehérjemérési eredményeink is megerősítenek.

HPLC mérések: A teljes lencsehomogenátumok fehérjetartalmát a fehérjemérést követően 1 mg/ml-re állítottuk be a homogenizáló puffer segítségével, míg a felülúszók fehérjetartalma ennél magasabb (mediánok a három csoportban: 1,45-2,50 mg/ml között) volt. Emiatt a minták aminosavtartalmát a fehérjetartalomra korrigáltuk.

Kísérleti rendszerünkben a p-Tyr mennyiségét nem mértük, hiszen annak mennyisége két-három nagyságrenddel meghaladta a DOPA, o-Tyr és m-Tyr koncentrációját. A m-Tyr a felülúszó minták többségében a kimutathatóság alatti mennyiségben volt jelen. A mintákat ebből a szempontból összehasonlítva, a m-Tyr kimutathatósága magasabb volt a non-DM CAT csoport felülúszóiban (18/22, kimutatható/összes eset) mint a CONTR (7/17) és a DM CAT (10/20) csoportban (chi-négyzet teszt, $p < 0,05$). A totál homogenátumokban a m-Tyr kimutathatósága magasabb volt a DM CAT (20/20) és a non-DM CAT csoportokban (22/22) mint a CONTR csoportban (11/17). A totál homogenátumok esetében χ^2 -tesztet a m-Tyr kimutathatóságára és a betegcsoportokra nem tudtunk matematikai okokból kifolyólag használni (a cellánként várt esetszám túl alacsony volt). A m-Tyr esetében csak azon mintákból számoltunk statisztikát, ahol a m-Tyr kimutatható volt.

Csoportok közötti összehasonlítások: Kiszámoltuk az aminosavak és a minták fehérjetartamának hányadosait, vagyis DOPA/fehérje, m-Tyr/fehérje, o-Tyr/fehérje és Phe/fehérje hányadosokat. A felülúszókban a DOPA és az o-Tyr jól kimutatható volt; azonban a felülúszó minták többségében a m-Tyr mennyisége a kimutathatósági határ alatt volt. Előző tanulmányainkban azt találtuk, hogy *in vitro* a m- és o-Tyr nagyjából ekvimoláris mennyiségben termelődnek, de az irodalomból ismert, hogy *in vivo*, bizonyos biológiai

mintákban az o-Tyr mennyisége akár tízszer is meghaladhatja a m-Tyr mennyiségét, ahogy ezt mintáinkban is láttuk.

A három csoportot összehasonlítva azt találtuk, hogy nem volt különbség a *felülúszók* DOPA/fehérje, m-Tyr/fehérje and o-Tyr/fehérje hányadosában a három csoport között. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a vízdékony fehérjék – amik a lencse felülúszókban megtalálhatók – azonos mennyiségű oxidált aminosavat tartalmaznak.

A DM CAT *felülúszók* Phe/fehérje aránya nem volt szignifikánsan alacsonyabb a CONTR mintákéhoz képest. Azonban a non-DM CAT csoport felülúszóiban szignifikánsan alacsonyabb Phe/fehérje arányt mértünk a CONTR csoporthoz képest.

A *totál homogenátumok* esetében a DOPA és az o-Tyr is mérhető volt. A CONTR minták totál homogenátumainak többségében a m-Tyr a kimutathatósági határ alatt volt, míg jól kimutatható volt a cataractás mintákban. Nem volt különbség a három csoport totál homogenátumai között a DOPA/fehérje arányban. Azonban a DM CAT és non-DM CAT csoportok m-Tyr/fehérje és o-Tyr/fehérje hányadosa is magasabb volt a CONTR mintákéhoz képest.

A *totál homogenátumok* esetében nem volt különbség a csoportok között a Phe tartalomban. A felülúszók és a totál homogenátumok fehérjéinek Phe-tartalmában lévő különbséget a felülúszók és a totál homogenátumok Phe/fehérje hányadosainak egymással történő elosztásával demonstráltuk: a CONTR csoportban a hányados mediánja 67% volt, és alacsonyabb volt a hányados a DM CAT és non-DM CAT csoportokban (26% illetve 30%, $p < 0.05$ vs. CONTR).

A felülúszóknak a totál homogenátumokkal történő összehasonlítása: Nem volt különbség a CONTR minták totál homogenátumainak és felülúszóinak DOPA/fehérje hányadosai között, azonban a DM CAT és non-DM CAT csoportokban magasabb volt a totál homogenátumok DOPA/fehérje hányadosa a felülúszókhoz képest.

A m-Tyr jól mérhető volt a DM CAT és non-DM CAT lencsék totál homogenátumaiban. A totál homogenátumok m-Tyr/fehérje hányadosa magasabb volt mindhárom csoporton belül a felülúszókéhoz képest. A felülúszókkal összehasonlítva magasabb volt az o-Tyr/fehérje hányados a DM CAT és non-DM CAT csoportok, de nem a CONTR csoport totál homogenátumaiban. Mindhárom csoportban magasabb volt a totál homogenátumok Phe/fehérje hányadosa a felülúszókhöz képest.

A HPLC vizsgálatban azt találtuk, hogy az oxidált aminosavak felszaporodnak a cataractás lencseminták totál homogenátumainak fehérjeiben, ezt a folyamatot nem kíséri ugyanezen hidroxil szabad gyök markereknek a cataractás minták felülúszóiban történő felszaporodása. Ez a két eredmény együtt indirekten azt igazolja, hogy az oxidatív stressz markerek felszaporodása a cataractás lencsefehérjék nem vízdékony fázisában következik be.

Nem ismert, hogy van-e kapcsolat a Phe-oxidáció és a lencsefehérjék oldhatatlanná válása között, természetesen elképzelhető, hogy a két jelenség ugyanazon kórtani elváltozás két független kimenetele. Azonban azt tudjuk az irodalomból, hogy a krisztallin-típusú fehérjék néhány Phe-oldallánca fontos szerepet játszik a krisztallinok chaperone működésében vagyis a lencsefehérjék oldhatóságában. Ismert, hogy ezen Phe oldalláncok egyetlen pontmutációja is teljesen tönkretelheti a chaperone funkciót. Elképzelhető, hogy a kulcspozícióban lévő Phe aminosavak hidroxil szabad gyökös módosítása is megváltoztathatja a fehérje oldékonyságot, ezáltal hozzájárulva a cataracta kialakuláshoz.

A felülúszók és totál homogenátumok eltérő Phe tartalma és a cataractás lencseminták kontrollokhoz képest alacsonyabb Phe tartalma valószínűleg nem a Phe hidroxil szabad gyök általi felhasználódásának következménye, mivel körülbelül 3-4 nagyságrendnyi különbség van a fehérjék Phe és a fehérjék m- és o-Tyr tartalma között (Phe vs. m-Tyr és o-Tyr, kb. 1000 $\mu\text{mol/g}$ vs. 20 nmol/g és 200 nmol/g). Továbbá alacsonyabb Phe/fehérje hányadost

mértünk valamennyi felülúszóban anélkül, hogy ugyanitt az oxidált aminosavak felszaporodtak volna. A non-DM CAT csoportok felülúszójában további csökkenés volt megfigyelhető a kontrollokhöz képest, melyet szintén nem kísért az oxidált aminosavak felszaporodása. Így tehát a Phe tartalombeli különbségek inkább arra utalnak, hogy másfajta fehérjék találhatóak a lencse vízdékony és nem vízdékony komponenseiben.

4.5. Az angiotenzin konvertáló enzim genotípusa és a klinikai paraméterek közötti kapcsolat 2-es típusú cukorbetegekben történő vizsgálatának eredményei. (V., VII., VIII. közlemény)

A főbb klinikai jellemzőket tekintve nem volt szignifikáns különbség az II (n = 27), ID (n = 68) és DD (n = 50) genotípusú betegek között. A betegek ACE genotípus szerinti csoportosításakor azt találtuk, hogy a szérum fruktózamin szintek szignifikánsan magasabbak voltak a DD csoportban, mint az II csoportban. A betegeket a D allél jelenléte illetve hiánya szerint csoportosítva (II vs. ID+DD genotípusok) szignifikánsan magasabb fruktózamin szintet találtunk az ID+DD csoportban, mint az II csoportban. Medián teszt és a betegek medián feletti és –alatti csoportba sorolásával szignifikáns kapcsolatot találtunk az ACE gén polimorfizmus és a szérum fruktózamin szintek között.

Azt is meg kívántuk vizsgálni, vajon a renin-angiotenzin rendszer ACE gátló révén történő gátlása más glikémiás profillal jár-e együtt. Azt találtuk, hogy az ACE gátlót szedő betegek szignifikánsan alacsonyabb fruktózamin szinttel rendelkeztek, mint akik nem kaptak ilyen típusú szert.

A betegeket az ACE genotípus szerint csoportosítva azt találtuk, hogy a napi albuminürítés a legmagasabb a DD genotípusú betegek esetén volt. A metabolikus paramétereket megvizsgálva szignifikáns korrelációt találtunk a szérum fruktózamin szintek, a vércukorszint és a Hb A_{1c} között. Mind a plazma glükózszint, mind a fruktózamin jól korrelált az albuminuriával, a Hb A_{1c} azonban nem.

Megvizsgáltuk a gamma glutamil transzferáz (γ -GT) enzim aktivitását is, amely enzimnek többek között az antioxidáns védelmi rendszerben is szerepe van. A γ -GT enzim aktivitások jól korreláltak a C-reaktív proteinnel és a szérum karbamid nitrogénnel, a vesekárosodás egyik markerével (korra korrigálva).

Nem volt szignifikáns pozitív korreláció a γ -GT és a szérum bilirubin (mint májkárosodási marker) között. Továbbá nem volt különbség a különböző ACE genotípusú csoportok szérum bilirubin szintjei között sem. Mindezen tények ellenére sem lehet eredményeink háttérében a nem alkoholos zsírmáj (non-alcoholic steatosis hepatitis, NASH) szerepét teljesen kizárni. Ezen eredmények alapján azonban úgy gondoljuk, hogy a nem májbeteg diabéteszes páciensekben a γ -GT-t egy mikroinflammációs és oxidatív stressz markernek is tekinthetjük.

4.6. A glutation peroxidáz genotípus és az L-arginine analógok szérumszintje között (VI. közlemény)

Betegeinkben (n=148) a genotípusok megoszlása és az allélgyakoriságok nem tértek el szignifikánsan a Hardy-Weinberg egyenlettől. Nem volt különbség a plazma SDMA szintekben a P allélt hordozó és nem hordozó (PP és PL vs. LL) csoportok között. Azonban az LL genotípusú betegek ADMA és L-NMMA szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a P allélt hordozó betegeknél.

Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy a rosszabb GPX-1 genotípusú betegek magasabb oxidatív stressz szintje az L-Arg analógok felszaporodásához vezethet. Mivel a csoportokat magas vérnyomásra is illesztettük, nem tudjuk megmondani, hogy a magasabb L-Arg analóg szintek magas vérnyomás kialakulásához is vezetnek-e.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján a fluoreszcens mérési technikák (mind a spectrofluorimetria mind a HPLC) alkalmasak a szabad gyökös rendszerben a Phe-Tyr átalakulás monitorozására. A vas redox átalakulása és az $\cdot\text{O}_2^-$ termelődése szükséges az aminosav módosulásához. A Tyr termelődést a vas-kelátorok is befolyásolták: ATP gátolta, citrát és EDTA fokozták a Phe-Tyr átalakulást. Az oldat pH-ja is kritikus fontosságú, a foszfátpuffer használata csökkentette a Tyr termelődést. A citrát – feltehetőleg autoxidáció révén – H_2O_2 hiányában is fenn tudja tartani a reakciót.

Azt találtuk, hogy a fiziológiás p-Tyr-t az egészséges és beteg vese is visszatartja, és termelődése veseelégtelenségben csökkent. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a vizelet és plazma o-Tyr mérése jó módszer a hidroxil szabad gyök indirekt kimutatására. Kettes típusú cukorbeteg vagy cukorbeteg és vesebeteg páciensekben az o-Tyr vizeletürítése fokozódik a vesében történő o-Tyr szekéció vagy az o-Tyr *in loco* termelődése miatt.

Egy másik tanulmányban indirekt módon kimutattuk az oxidált aminosavak felszaporodását a lencsefehérjék nem vízdékony fázisában, nagy mólsúlyú aggregátumok jelenlétét a cataractás teljes homogenátumokban és a cataractás lencsék vízdékony fázisában a fehérjetartam csökkenését. Az oxidált aminosavak felszaporodása és a Phe oldalláncok oxidatív módosulása kapcsolat lehet a fehérjekárosodás és a lencsehomály között.

Roszbabb glikémiás státuszt, súlyosabb albuminuriát találtunk az előnytelen ACE genotípussal rendelkező cukorbetegekben valamint az ACEI-vel nem kezelt betegekben. Továbbá az előnytelen GPX-1 genotípusú betegekben magasabb L-Arg analóg szinteket mértünk.

6. A DOKTORI (Ph.D.) TÉZISEK LISTÁJA:

1. Az *in vitro* fenilalanin-tirozin konverziót felhasználhatjuk az esszenciális aminosav fenilalaninnak egy fém-katalizált oxidációs reakcióban létrejövő, hidroxil szabad gyök okozta károsodásának kimutatására.
2. A fém-katalizált, Fenton-szerű reakcióban a tirozin mindhárom izomere, vagyis a para-, a meta- és az orto-tirozin is létrejön. A fenilalanin oxidációját antioxidánsokkal kivédhetjük, emellett a reakciót vas-komplexe jelenléte és a pH is befolyásolja.
3. A hidroxil szabad gyök marker orto-tirozin felszaporodik a 2-es típusú cukorbetegék és/vagy krónikus vesebetegék vizeletében.
4. Az orto-tirozin renális transzportja különbözik a para-tirozintól, és 2-es típusú cukorbetegben egy fokozott orto-tirozin szekréció vagy *in loco* termelés van jelen.
5. Diabéteszes és nem diabéteszes cataractás szemlencsék nem vízdékony fehérjefrakciójában felszaporodik az orto-, a meta-tirozin és a dihidroxi-fenilalanin.
6. A cataractás lencsék vízdékony komponenseinek fenilalanintartalma eltér a teljes lencse homogenátumokétól.
7. A renin-angiotenzin rendszer, vagyis az angiotenzin konvertáló enzim D allélje befolyásolhatja a szénhidrát anyagcserét, és fokozott oxidatív stresszhez vezethet 2-es típusú cukorbetegben.
8. Az antioxidáns glutation peroxidáz enzim befolyásolhatja az L-arginin analógok szérumszintjét és ezáltal megelőzheti az endotél-diszfunkciót 2-es típusú cukorbetegben.

7. A tézisekhez felhasznált absztraktok és közlemények jegyzéke

A tézisek az alábbi *absztraktokon* alapulnak (ld. számozás a fejezetcímeknél):

- I. **G. Molnár**, Z. Wagner, L. Wagner, P. Degrell, Z. Matus, B. Kocsis, B. Laczy, J. Nagy, I. Wittmann: Ferric iron and its complexes induce para-, meta – and ortho-tyrosine formation from phenylalanine in the presence of hydrogen peroxide. Role of the superoxide free radical in the reaction. *Diabetologia* 46 (S2): A403 (2003), **imp. fact.: 5.689**
- II. **Molnár G.**, Wagner Z., Wagner L., Degrell P., Matus Z., Kocsis B., Laczy B., Nagy J., Wittmann I.: A vas (III)- hidrogén peroxid rendszerben szuperoxid gyök képződése kell a fenilalanin hidroxilációjához. A vas (III)-komplexe szerepe. *Hypertonia és Nephrologia* 7 (S3): 88 (2003)

A tézisek az alábbi *közleményeken* alapulnak (ld. számozás a fejezetcímeknél):

- III. **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 International* 68 (5):2281-2287 (2005), **imp. fact.: 4.927**
- IV. **G. A. Molnár**, V. Nemes, Zs. Biró, A. Ludány, Z. Wagner, I. Wittmann: Accumulation of the hydroxyl free radical markers meta-, ortho-tyrosine and DOPA in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free Radical Research* 39 (12): 1359-1366 (2005), **imp. fact.: 2.323**
- V. **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 inzerációs/deléciós polimorfizmusa egyaránt befolyásolja a szénhidrát anyagcserét, az oxidatív stresszt és a célszerv-károsodást 2-es típusú diabétesz mellitusban. *Orvosi Hetilap* 145 (16): 15-19 (2004)
- VI. T. Szelestei, S. Bähring, Z. Wagner, A. Aydin, **G. A. Molnár**, J. Nagy, I. Wittmann: Serum levels of L-arginine analogues and glutathione peroxidase and catalase gene variants in Type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetic Medicine* 22: 356-357 (2005), **imp. fact.: 2.725**
- VII. I. Wittmann, **G.A. Molnár**, P. Degrell, Z. Wagner, M. Tamaskó, B. Laczy, P. Brasnyó, L. Wagner, J. Nagy: Prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 68 (S1): S36-42 (2005), **imp. fact.: 1.236**, citation: 1
- VIII. 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. *American Journal of Kidney Diseases* 47: 294-300 (2006.), **imp. fact.: 4.412** (in 2005), citations: 6

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is, kimondhatatlanul hálás vagyok *Szüleimnek, Nagyszüleimnek, és a Családomnak*, akik egész életemben támogattak döntéseimben, akiknek köszönhető, hogy ma itt lehetek, akik megpróbáltak arra megtanítani, hogyan cselekedjek helyesen az életben. Bár nem állhatnak mindig és mindannyian mellettem, valamilyen formában mégis mindig velem vannak.

Ez a dokumentum és az eredmények messze nem csak az én munkám, hanem mindannyiunk munkájának is köszönhetőek. Örülök, hogy az elmúlt években egy fiatalabb és tapasztaltabb kollégákból, klinikusokból, kutatókból, asszisztensekből, együttműködő partnerekből, TDKs hallgatókból álló kutatócsoport tagja lehettem. Mindannyiuknak hálás vagyok segítségükért, néhányukat név szerint is megemlítve:

- *Wittmann István* professzor úrnak és *Nagy Judit* professzornőnek mindazokért a tudományos és klinikai ismeretekért, a gondolkodásmódért, amit megosztottak velem, hogy segítettek elindulni a tudomány néha bizony rögzös útján, támogatásukért, a kritikáért, azért, hogy megpróbáltak szerénységre nevelni; azért az időért és energiáért, amit belém fektettek. Remélem, egyszer megtérül...
- *Wagner Zoltánnak, Wagner Lászlónak, Mazák Istvánnak* tanácsaikért, azért, hogy megmutatták, honnan, merre kell elindulni, hogyan leljek örömet a munkámban, és barátságukért,
- *Sámikné Varga Icának*, aki kiváló asszisztencia mellett sok mindennel segített munkámban,
- *Markó Lajosnak, Laczy Boglárkának, Tamaskó Mónikának* a laborban közösen töltött évekért, hogy mellettük megtanultam, mi a felelősség, hogyan örüljek mások sikereinek, és hogyan kell egymást segítve egy csoportban dolgozni,
- *Bodor Enikőnek és Szabóné Eminek*, a nem csak adminisztratív segítségükért és türelmükért,
- *Degrell Péternek*, mert rávett, hogy néha másképp gondolkodjak, valamit a “véget nem érő” beszélgetésekért,
- *Matus Zoltánnak* kémiai ismereteiért, idejéért és türelméért, amit nem mindig csak a HPLC vett igénybe; *Kocsis Bélának* a módszereink beállításában nyújtott segítségével és az egyedülálló ELISA mérésért,

- *Ludány Andreának* őszinteségeért, kedvességéért és az építő kritikáért; *Biró Zsoltnak* és *Nemes Vandának*, a cataractás betegek mintáiért, klinikai adataiért, és kiváló együttműködésükért, *Melegi Béla* professzornak a genetikai vizsgálatokért,
- *Póty Lászlónak*, statisztikai ismeretei mellett oly sok másért; *Kőszegi Tamásnak* és *Magyarlaki Tamásnak*, akik mindig pontosan és „SOS-ben” analizálták mintáinkat,
- *György Erzsébetnek* (*Zsókéának*), *Heitmanné Anikónak*, *Udvarács Ildikónak*, *Wéber Tündének*, *Meenakshi Ghoshnak*, *Kiss Anikónak*, *Stein Anikónak*, *Grozdiczné Tündének*, *Kiss Ibojának* asszisztenciájukért, társaságukért és sok másért,
- *Fábián Györgynek*, *Késői Istvánnak*, *Kovács Tibornak*, *Pintér Istvánnak*, *Schmelczer Matildának*, *Sebők Juditnak*, *Szigeti Nórának*, *Szelestei Tamásnak* és *Vas Tibornak*, akik megengedték betegeik bevonását vizsgálatainkba, a *gyakornokoknak* és a *nővéreknek* segítségükért,
- *Friedrich C. Luftnak*, *Anette Fiebelernak*, *Dominik Müllernak*, akik lehetővé tették, hogy némi tapasztalatot gyűjtsek Németországban is, és akik elnézték nekem, hogy munkám mellett/közben a téziseimet írtam, *Florian Hersenek*, *Lydia Heringnek*, *Sandra Feldtnek* és a *többieknek*, a *berlini csoportból* barátságukért,
- *Niklai Évának*, *Norbertnek* és *Dominiánának* a velük töltött időért és türelmükért,
- *Mindenkinek*, aki a fentiekben nem került felsorolásra, de segített a munkámban vagy magánéletemben,
- *Kedvesemnek*, *Vágási Katinak*, aki elviselte, bármit is tettem; és aki még a berlini sötét, esős napokba is fényt tudott hozni...

Rajtuk kívül a munkát támogatta még az Egészségügyi Tudományos Tanács ETT 562/2003 pályázata, az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok T-043788 pályázata, és a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János kutatói ösztöndíja, melyeket Nagy Judit professzornő, Wittmann István és Wagner László nyertek el.

A fent ismertetett adatok egy része 2004 májusában szabad előadásként bemutatásra került az Európai Vesetársaság éves konferenciáján, amelyért és az ehhez nyújtott támogatásért köszönettel tartozom a Társaságnak.