

Az oxidatív stressz, szubklinikus inflammáció és fehérje O-GlcNAciláció szerepe diabetes mellitusban, iszkémia-reperfúzióban és krónikus vesebetegségben

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Laczy Boglárka

Témavezetők:
Prof. Dr. Wittmann István
Prof. Dr. John C. Chatham

Programvezető:
Prof. Dr. Nagy Judit

Doktori Iskola Vezetője:
Prof. Dr. Komoly Sámuel



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

**University of Alabama at Birmingham, School of Medicine
Division of Cardiovascular Disease, Birmingham**

Pécs, 2011

RÖVIDÍTÉSEK

ACC: acetil-koenzimA-karboxiláz	LDH: laktát-dehidrogenáz
ACE-I: angiotenzin-konvertáló-enzim-inhibitor	LVDP: balkamrai nyomáskifejlődés
ACO: aconitáz 2	MALDI-TOF/MS: mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció-repülési idő analízis/tömegspektrométer
ACR: albumin-kreatinin-hányados	NADP: nikotinamid adenin dinukleotid-foszfát
AMPK: AMP(adenozin monofoszfát)-aktivált protein kináz	NAG-tiazolin: 1,2 didezoxi-2'-metil- α -D-glükopiranozo(2,1-d)- Δ 2'-tiazolin
ARB: angiotenzin-receptor-blokkoló	NMR: mágneses mag-rezonancia
ASA: acetil-szalicilsav	NO: nitrogén-monoxid
ATP: adenozin-5'-trifoszfát	OGA: β -N-acetil-glükozidáz; O-GlcNAc-áz
BMI: testtömeg index	O-GlcNAc: O-típusú β -N-acetil-glükózamin
CA-N: kardiovaszkuláris autonóm neuropathia	OGT: O-GlcNAc transzferáz
cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát	PF: pentoxifyllin
CKD: krónikus vesebetegség	PI3-K: foszfatidil-inozitol 3-kináz
CRP: C-reaktív protein	PKA: cAMP (ciklikus adenozin-monofoszfát) függő proteinkináz
CFP: cigarettafüst puffer	PKB: proteinkináz B/Akt
cTnl: kardiális troponin I	PKC: proteinkináz C
DAPI: 4',6 diamidin-2-fenilindol	PPS: pentozán poliszulfát
EDP: vég-diasztolés nyomás	PUGNAc: O-(2-acetamido-2-deoxi-d-glükopiranozilidén amino-N-fenilkarbamát)
eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz	RAS: renin-angiotenzin-rendszer
EPO: erythropoetin	ROS: reaktív oxigén termék(ek)
FAT: zsírsav transzlokáz/transzporter; CD36	RPP: pulzusnyomás-munka
GFAT: glutamin: fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz	Ser/Thr: szerin/threonin
GFR: glomeruláris filtrációs ráta	T2DM: 2-es típusú diabetes mellitus
GP: glikogén foszforiláz	TCA: trikarbonsav
GSH: redukált glutation	TNF: tumor nekrozis faktor
H₂O₂: hidrogén-peroxid	UDP-GlcNAc: uridin difoszfó-N-acetil-glükózamin
HBP: hexózamin-bioszintézis útvonal	UDP-HexNAc: uridin difoszfó-N-acetil-hexózamin
HIF: hipoxia indukálta transzkripció faktor	ZDF: zucker diabetic fatty
HPLC: nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia	
IL: interleukin	
I/R: iszkémia-reperfúzió	
KHB: Krebs-Henseleit bikarbonát	

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

1. Oxidatív stressz és endoteliális diszfunkció: *In vitro* kísérletek a cigarettafüst okozta elváltozások vizsgálatára endotélsejtekben.

A károsodott endotél-funkció meghatározó szereppel bír számos, fokozott ateroszklerózissal összefüggő makrovaszkuláris megbetegedésben, például ischaemiás szívbetegségben, hypertóniában, diabetes mellitusban, krónikus vesebetegségben (CKD). A mikrovaszkuláris szintű endotél-diszfunkció pedig szoros összefüggést mutat az inzulin-rezisztencia és a mikroalbuminuria kialakulásával.

A dohányzás számottevő kockázati tényező a makro- és a mikroangiopátiás szövődmények progressziójában. A cigarettafüst reaktív oxigén termékek (ROS) fokozott felszabadulásán keresztül oxidatív stresszt indukál az érfali endotélsejtekben ezáltal funkcionális károsodásokhoz vezet, amelyek közül az egyik legjelentősebb az endotél-függő vazodilatáció elégtelensége a nitrogén-monoxid (NO) csökkent hozzáférhetősége következtében; ennek hátterében többnyire csökkent eNOS (endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz) enzim-aktivitás áll. Az eNOS aktivitásának szabályozása meglehetősen összetett, azonban jól ismert, hogy azt a poszttranszlációs foszforilációs folyamatok jelentősen befolyásolják; míg az eNOS Ser(1177) oldalláncán történő foszforiláció növeli, addig a Thr(495) foszforilációja csökkenti az eNOS-aktivitást és így az NO termelődését. Amíg mások és általunk is jól demonstrált tény, hogy a cigarettafüst endotél-diszfunkcióhoz vezet az eNOS - NO - cGMP/ciklikus guanozin-monofoszfát/ útvonal integritásának különböző pontokon történő megzavarásával, addig az eNOS poszttranszlációs módosulásaira kifejtett hatásai, valamint a résztvevő proteinkinázok szerepe nem tisztázott.

Célkitűzések:

- (i) cigarettafüst puffer (CFP) akut hatásának vizsgálata az eNOS foszforilációjára és dimerizációjára;
- (ii) meghatározni, hogy redukált glutationnal (GSH) kivédhető-e ezek a CFP indukálta változások;
- (iii) proteinkinázok közvetítő szerepének vizsgálata a CFP indukálta eNOS foszforilációk létrejöttében szelektív proteinkináz (PK) inhibitorok (PKA-, PI3-K (foszfatidil-inozitol 3-kináz)/PKB-, és PKC-inhibitorok) felhasználásával;
- (iv) PKC β II-specifikus inhibitor (ruboxistaurin) esetleges védő hatásának vizsgálata a CFP indukálta eNOS foszforilációk hátterében;

2. Oxidatív stressz és kardiális diszfunkció: *Ex vivo* kísérletek a fehérje O-GlcNAciláció kardioprotektív szerepének vizsgálatára iszkémia-reperfúzióban izolált, perfundált patkányszívben.

A hexózamin-bioszintézis útvonal (HBP) krónikus aktivációját és annak következtében megnövekedett szöveti O-GlcNAc (O-típusú β -N-acetilglükózamin)-szinteket károsnak vélik a glükóztoxicitás és inzulin-rezisztencia patogenezisében. Ugyanakkor, egyre több bizonyíték szól amellett, hogy ezen anyagcsereutak akut aktivációja védő hatású számos, kardiovaszkuláris rendszert érintő károsodással szemben.

A fehérjék O-GlcNAciláció-s poszttranszlációs módosulása, mint jelátviteli mechanizmus egyre elfogadottabbá válik a sejtfunkció sokrétű szabályozásában (pl. nukleáris transzport, transzláció, transzkripció, citoskeletális reorganizáció, proteosomális degradáció, apoptózis). Ezt a folyamatot, vagyis egyetlen O-GlcNAc molekula reverzibilis kötődését a sejtmagban és citoszolban elhelyezkedő fehérjék Ser/Thr oldalláncain két enzim szabályozza: O-GlcNAc transzferáz (OGT) az O-GlcNAc kötődését, míg a β -N-acetilglükózaminidáz (O-GlcNAc-áz, OGA) a leválasztását katalizálja. Az OGT katalitikus aktivitása igen érzékeny az UDP-GlcNAc (uridin difoszfó-N-acetil-glükózamin) sejten belüli koncentrációjára, ami a HBP végterméke. Az intracelluláris glükóz kis hányadának HBP-n keresztüli metabolizmusát és így az UDP-GlcNAc szintézisét a GFAT (L-glutamin-D-fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz) enzim szabályozza. A glükózamin, amely a glükóz transzporter rendszeren át jut be a sejtekbe, az UDP-GlcNAc- és így az O-GlcNAc-szintek gyors emelkedését idézi elő, azáltal, hogy glükózamin-6-foszfáttá foszforilálódik hexokinázok hatására, vagyis képes megkerülni a HBP sebességét meghatározó GFAT enzimet. A fehérjék O-GlcNAcilációja fokozható OGA-gátlókkal, például PUGNAc-val (O-(2-acetamido-2-deoxi-d-glükopiranozilidén amino-N-fenilkarbamát) vagy NAG-tiazolin származékokkal [pl. NBt: 1,2 didezoxi-2'-propil- α -D-glükopiranozo(2,1-d)- Δ 2'-tiazolin; NAe: 1,2 didezoxi-2'-etilamino- α -D-glükopiranozo(2,1-d)- Δ 2'-tiazolin].

Több *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatban glükózamin vagy PUGNAc adása az O-GlcNAc-szintek növelésével védőhatású volt iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodással szemben. Azonban alacsony specificitásuk és egyéb hatásaik miatt eltérő fiziológias hatásaik is lehetnek, amelyek befolyásolhatják eredményességüket és esetleges használhatóságukat. Közelmúltban kerültek kifejlesztésre új, nagy-szelektivitású OGA-

gátlók, a NAG-tiazolinok; például a NBt ~1500-szor specifikusabb OGA-gátló, mint a PUGNAc, vagy a NAe még hatékonyabb, mint a NBt (~30-szor). Bár egyiket sem tesztelték szervszinten I/R károsodásban. Több patológiás stresszre már ismerjük a szívben az O-GlcNAc-szintek teljes változásait, azonban keveset tudunk a sejten belüli O-GlcNAc-megoszlásról akár intakt szívben, vagy iszkémiát és I/R-t követően. Szintén nem ismertek I/R során azok az O-GlcNAc-célfehérjék, melyek képesek hozzájárulni a miokardium megőrzéséhez.

Célkitűzések:

- (i) igazolni, hogy reperfúzió során az OGA szelektív gátlása NBt-vel és NAe-vel csökkenti az izolált szív I/R-okozta károsodását;
- (ii) meghatározni az iszkémia, I/R és OGA-gátlás hatását az O-GlcNAc-szintek kardiális eloszlására;
- (iii) meghatározni, hogy OGA-gátlással kivédhető-e az iszkémia és I/R okozta elváltozások a miokardiális integritásban és a Z-vonal fehérjékben;
- (iv) iszkémia és I/R során módosult O-GlcNAc-célfehérjék identifikálása;

3. Tanulmányok a fokozott HBP és protein O-GlcNAciláció, mikro-inflammáció és oxidatív stressz patogenetikai szerepének vizsgálatára diabeteses szövődményekben és krónikus vesebetegségben.

3.1. *Ex vivo* kísérletek a fokozott HBP és a fehérje O-GlcNAciláció szívyanyagcserét befolyásoló hatásainak vizsgálatára.

A szív- és érrendszeri szövődmények a diabeteses betegek magas korai morbiditásának és mortalitásának vezető oka. Inzulin-rezisztencia és diabetes következtében a szívben az anyagcsere maladaptív zavara - megnövekedett zsírsav- és lecsökkent glükóz-felhasználás - jön létre, ami hozzájárul a diabeteses kardiomiopátia kialakulásához.

A diabetes számos szövetben (pl. vese, szív) az O-GlcNAc-szintek emelkedését idézi elő. A fokozott oxidatív stressz következtében kialakuló vaszkuláris-endoteliális diszfunkció hátterében jelentős szerepet tulajdonítanak a HBP és a fehérje O-GlcNAciláció tartós aktivációjának. A glükózaminnal serkentett HBP és O-GlcNAciláció hatására szívben is kimutatható néhány diabetesre jellemző elváltozás, azonban a metabolizmust érintő hatásokról keveset tudunk. Zsírsejtekben glükózamin a palmitát-

oxidáció növekedését idézte elő az AMPK/AMP-aktivált proteinkináz/ és ACC/acetil-KoA-karboxiláz/ O-GlcNAc függő aktivációja révén.

Célkitűzések:

- (i) meghatározni, hogy a glükózámmal aktivált HBP és O-GlcNAc-izáció a szívanyagcsere diabeteses fenotípusú változását eredményezi-e;
- (ii) meghatározni, hogy az AMPK, ACC vagy FAT(zsírsav transzporter)/CD36 aktivációja volt-e felelős a megváltozott szubsztrát-felhasználásért;
- (iii) megvizsgálni, hogy a membrán asszociált FAT/CD36 szintjének növekedése lehet-e direkt O-GlcNAc módosulás következménye;

3.2. *Klinikai tanulmány az anti-inflammatórikus pentoxifyllin és pentozán poliszulfát kombinációs kezelés hatékonyságának vizsgálatára diabeteses neuropathiában és albuminuriában 2-es típusú diabetes mellitusban.*

A diabetes mellitus késői vaszkuláris szövődményeinek hátterében számos tényező játszik szerepet, azonban az oxidatív stressz és krónikus gyulladás patogenetikai szerepe, legfőképp 2-es típusú diabetes mellitusban (T2DM) különösen nagy jelentőséggel bír. A fokozott gyulladás szoros összefüggést mutat mind a szív- és érrendszeri autonóm diszfunkció, mind az albuminuria kialakulásával és progressziójával, melyek a diabeteses neuropathia és nephropathia vezető tüneteiként ismeretesek. Gyulladásos folyamatok (citokinek, növekedési faktorok, adhézión molekulák felszaporodása) káros hatásai megváltozott vazoregulációs válaszban, fokozott vaszkuláris permeabilitásban, leukocytá-adhéziónban és facilitált thrombusképződésben nyilvánulhatnak meg, ily módon a vasa nervorum vagy a glomerulusok szintjén is mikrovaszkuláris diszfunkciót okoznak. Ezen túlmenően, a kedvezőtlen hemorheológiai körülmények (pl. hypercoagulabilitás, hyperviszkozitás) és vörösvértest abnormalitások (pl. csökkent deformabilitás, -O₂-kötő kapacitás, fokozott aggregáció) szintén rontják a mikroangiopátiát.

A diabeteses neuropathia és nephropathia specifikus kezelése, többek között a multifaktoriális patomechanizmus miatt nem kivitelezhető. Újabban, néhány ígéretesnek tűnő szer, mint a pentoxifyllin (PF), vagy pentozán poliszulfát (PPS) került az érdeklődés középpontjába, melyek potenciálisan késleltethetik a diabeteses nephropathia progresszióját; azonban esetleges jótékony hatásukat neuropathiában nem vizsgálták. PF és PPS köztudottan jelentős keringésjavító, anti-inflammatórikus

és anti-proteinuriás hatásokkal bírnak, így részben tüneti, részben oki terápiás lehetőséget kínálhatnak ezen mikrovaszkuláris károsodások javításában.

Célkitűzésünk volt a kombinált PF-PPS infúziós kezelés hatásának vizsgálata T2DM-es betegekben:

- (i) a kardiovaszkuláris autonóm és perifériás szenzoros funkcióra (neuropathia vonatkozásában);
- (ii) a vizeletalbumin-kiválasztás mértékére (nephropathia vonatkozásában);

3.3. *Klinikai tanulmány az erythropoetin-rezisztencia és az anti-inflammatórikus acetil-szalicilsav anaemiára gyakorolt hatásának vizsgálatára 2-es típusú diabetes mellitusban és krónikus vesebetegségben.*

T2DM-ben és CKD-ben gyakran megfigyelhető anaemia egyik legfontosabb etiológiai tényezője az erythropoetin (EPO) csökkent termelődése a peritubuláris intersticiális sejtek károsodása következtében. Ugyanakkor az EPO hatástalansága is szerepet játszhat, melynek létrejöttében a T2DM-ben és CKD-ben is fennálló fokozott oxidatív stressznek és szubklinikus gyulladásnak tulajdonítanak jelentőséget. Diabeteses nephropathiás betegekben ily módon még fokozottabb lehet az EPO-rezisztencia mértéke.

Az EPO elérhetőségének és az anaemia javításának céljából elterjedten alkalmazzák a hormonszubsztitúciós kezelést, azonban a gyulladáscsökkentők szérum EPO-szintekre és erythropoesisre gyakorolt hatásai nem ismeretesek. A ROS redox-szenzitív intracelluláris jelátvivő és transzkripció folyamatokban betöltött közvetítő szerepére példa a renális EPO-szekréció HIF-1-en (hypoxia indukálta transzkripció faktor) és hydroxil szabad gyökön keresztüli szabályozása. Lehetséges, hogy T2DM-ben és CKD-ben a ROS felszaporodása következtében zavarttá válik a HIF-1 aktivációja, ami szuppresszált EPO-szintézishez vezethet. Így feltételezhető, hogy a gyulladáscsökkentő és hydroxil gyökfogó ASA (acetil-szalicilsav) hatásos lehet az EPO-termelődés és az anaemia korrekációjában T2DM-es és CKD-s betegekben.

Célkitűzések:

- (i) az EPO-rezisztencia vizsgálata T2DM-es és/vagy CKD-s betegekben;
- (ii) az ASA hatásának vizsgálata az EPO szérumszintjére és az erythropoesis markereire T2DM-es és CKD-s betegekben;

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1) Egér endothelioma sejt-vonalból származó endotélsejteket inkubáltunk Krebs-Henseleit bikarbonát (KHB) pufferrel (Kontroll) vagy növekvő koncentrációjú (5 - 50%) CFP-vel különböző időtartamokig (5 - 30 perc) a dohányfüst koncentráció- és időfüggő akut hatásának vizsgálatára. A CFP elkészítéséhez vákuumcső-szivattyúval ellátott berendezést használtunk, amelynek segítségével a cigarettákat (Camel®) konstans vákuummal (-5 vízcm) egységes ideig (5 perc) szívattuk el, és a cigarettafüstöt 5 ml KHB pufferban nyelettük el. Antioxidáns kísérletekben KHB pufferben oldott GSH (5 mM; 15 perc) előkezeléseket használtunk. A proteinkináz útvonalak szerepének tisztázásához a következő inhibitorokat alkalmaztuk: 1) szelektív PKA-inhibitor (H-89; 10 μ M); 2) szelektív PI3-K/PKB-inhibitor (LY-294002; 100 μ M); 3) szelektív PKC-inhibitor (Ro-318425; 1 μ M); és 4) izoforma-specifikus PKC β II-inhibitor (Ruboxistaurin; 30 nM). Immunblot analízisekben meghatároztuk a P(foszfo)-Ser(1177) és P-Thr(495) eNOS, total eNOS, P-Ser(473) és total Akt, valamint a dimer eNOS szintjeit, majd denzitometriás és statisztikai elemzéseket végeztünk (ANOVA-Dunnett's posthoc teszt, párosítatlan t-teszt, Jonckheere-Terpstra teszt; SPSS 10.0, SPSS Inc.)

Az alább felsorolt állatkísérletek a University of Alabama at Birmingham Helyi Állatgondozási és Alkalmazási Bizottságának (Institutional Animal Care and Use Committee) engedélyével történtek és megfeleltek a 'Guide for the Care and Usage of Laboratory Animals' (NIH Publication No. 85-23, 1996) követelményeinek.

2) Hím, nem-éheztetett Sprague-Dawley patkányszíveket ketamin altatás után izoláltunk és Langendorff-módszerrel retrograd úton perfundáltuk csak glükóz szubsztrátot tartalmazó KHB pufferrel, konstans nyomással (75 Hgmm). A szívfunkciókat nyomásmérő transzducerhez csatlakoztatott balkamrai folyadékballonon keresztül monitoroztuk, melynek felfújásával a vég-diasztolés nyomást (EDP) 5 Hgmm-en tartottuk. Az alábbi származtatott paraméterekkel határoztuk meg a szívteljesítményt: balkamrai nyomáskifejlődés (LVDP = max. szisztolés nyomás – EDP), nyomásgörbe-függvény időre vetített deriváltja ($\pm dP/dt = \text{maximum/ minimum rate of LVDP}$), és pulzusnyomás munka (RPP, rate pressure product = szívfrekvencia X LVDP). Stabilizálás (30 perc) után a szívek random kerültek idő-kontroll, normoxia csoportba (Norm) vagy a négy I/R csoport egyikébe, ahol 20 perc globális iszkémiát követően a 60 perces reperfúzió ideje alatt: 1) kezelést nem (Control) vagy 2) 50 μ M NBt (NBt50), 3) 100 μ M NBt (NBt100), 4) 50 μ M NAe (NAe) kezeléseket kaptak. Reperfúzió alatt nyomásgörbéken figyeltük a kamrai tachycardiát (VT, négy vagy több

egymásutáni ektópiás ütés) és fibrillációt (VF, gyors mechanikus aktivitás minimális LVDP mellett). A kardiális troponin I (cTnI) szintjét a (reperfúzió 15., 30., 45. és 60. percében gyűjtött) koronária-effluensből mértük ELISA-val. Az ATP- és UDP-HexNAc-szinteket a fagyasztott szívek perklórsavas extraktumából mértük HPLC-vel.

Az O-GlcNAc, desmin és vinculin szöveti eloszlását indirekt immunfluoreszcenciával detektáltuk epifluoreszcens mikroszkóppal. Iszkémia indukálta különbségek vizsgálatára egyes szíveket csak 20 perces iszkémiának tettünk ki. A paraffinba-ágyazott metszeteket O-GlcNAc- (CTD110.6), desmin-, és vinculin-ellenes elsődleges antitestekkel inkubáltuk és Alexa Fluor-konjugált másodlagos antitestekkel vizualizáltuk a sejtmagokra specifikus DAPI-val (4',6 diamidino-2-fenilindol) együtt. Az immunblot analízisekhez fagyasztott szívek homogenizátumait, teljes szöveti, valamint sejtmag-, citoszol-, membrán- és mitokondriális-frakciók lizátumait használtuk. A membránokat O-GlcNAc (CTD110.6), OGT, P-Tyr(822) és total vinculin, desmin, glikogén-foszforiláz (GP), aconitáz 2 (ACO) fehérjékre jelöltük és vizualizáltuk.

Az O-GlcNAc-asszociált fehérjét Western blottal (CTD 110.6) jelöltük, majd a Coomassievel festett gél megfelelő fehérjesávjait kimetszettük és tripszines emésztés után MALDI-TOF tömegspektrometriás detektáláshoz készítettük elő. A peptid tömegspektrumokat analizáltuk (Voyager Explorer) és összevetettük a Swiss-Prot adatbázissal (Mascot software). Szívperfúziós csoportok voltak: 1) idő-kontroll, normoxiás; 2) iszkémiás (10 perc); és 3) 10 perc iszkémia utáni reperfúziós (60 perc). A vinculin, GP és ACO fehérjék O-GlcNAc módosulását és asszociációjukat OGT-vel immunoprecipitációval vizsgáltuk. Az ACO aktivitását a NADP-redukciójához kapcsolt citrát és α -ketoglutarát átalakulási reakcióban mértük spektrofotometriásan (340 nm).

Statisztikai elemzések ANOVA-Bonferroni's posthoc teszt, Pearson's korreláció, χ^2 -teszt, párosítatlan t-teszt voltak (Prism 4.0, GraphPad Inc.).

3.1) Nem-éheztetett, hím Sprague Dawley patkányok szívét a 2. pont-ban leírtak szerint perfundáltuk standard körülmények között. A perfúziós KHB puffer tartalmazott (mM) glükózt 5,0, laktátot 1,0, piruvátot 0,1, palmitátot 0,32, glutamint 0,5 és 50 μ U/ml inzulint. Az izolált szíveket random módon osztottuk a hat csoport egyikébe és perfundáltuk 60 percig normoxiásan a következő glükózamin koncentrációkkal: 1) 0 mM (n=8); 2) 0,05 mM (n=5); 3) 0,1 mM (n=8); 4) 1,0 mM (n=4); 5) 5,0 mM (n=8); és 6) 10,0 mM (n=7). A szíveket a protokoll utolsó 40 percében [U - ^{13}C]-palmitáttal, [3 - ^{13}C]-laktáttal és [2 - ^{13}C]-piruváttal perfundáltuk. ^{13}C -NMR izotopomer analízissel

határoztuk meg az egyes energiaszubsztrátok trikarbonsav (TCA) ciklusba való belépésének arányát a teljes acetil KoA-ban. ¹H-NMR spektrométerrel határoztuk meg a laktát-kiáramlás és -felvétel mértékét. ATP és UDP-HexNAc szintjét HPLC-vel mértük. Fagyasztott, porított szívekből teljes szöveti és membránfrakciót tartalmazó homogenizátumokat készítettünk. A membránokat O-GlcNAc-re (CTD110.6), valamint P-Ser(79) és total ACC, P-Thr(172) AMPK- α és total AMPK- α , illetve FAT/CD36 fehérjékre jelöltük és vizualizáltuk. A FAT/CD36 immunoprecipitációját O-GlcNAc (CTD 110.6), OGT és FAT/CD36 jelölésekkel komplettáltuk. Statisztikai elemzésekhez ANOVA-t (Dunnnett's posthoc teszt) és párosítatlan t-tesztet használtunk (Prism 4.0, GraphPad Inc).

Az alább felsorolt klinikai vizsgálatok a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kara Regionális Etikai Bizottságának engedélyével és a résztvevők írásos beleegyezésével történtek.

3.2) Placebo-kontrollált tanulmányunkban T2DM-es (≥ 1 év tartam) és disztális szenzoros neuropathia tüneteit mutató betegek két csoportját vizsgáltuk: 1) kezelt betegek (Verum; n=77) naponta egyszer kaptak kombinált PF (100 mg, Trental®) és PPS (100 mg, SP54®) infúziókat 5 napon át; 2) kezeletlen, kontroll egyének (Placebo; n=12) Salsol infúziókban (500 ml) részesültek. A kontroll betegek csoportja illesztett volt korra, nemre, T2DM tartamra, BMI-re, hemoglobin A_{1c}-re és vesefunkcióra. Az ACE-I és/vagy ARB, statin, vagy trombocita-gátló kezelésben nem volt különbség a csoportok között. A kizárási kritériumok a következők voltak: egyéb etiológiájú neuropathia, súlyos máj- és szívelégtelenség, CKD (szérum kreatinin $>200 \mu\text{mol/l}$), ritmuszavar, hypertonia ($>160 \text{ Hgmm}$), előrehaladott retinopathia, vérzés, mozgás- és együttműködési képtelenség. A vizsgálatok a hospitalizáció első napján (terápia előtt) és az ötödik napján (terápia után) történtek. A CA-N-t (kardiovaszkuláris autonóm neuropathia) a Ewing-féle, öt standardizált reflex-teszttel vizsgáltuk, melyek a szívfrekvencia-változásokat [mélylégzés (ki/belégzési hányados), Valsalva manőver (Valsalva hányados), és felállás (30/15 hányados)] és a vérnyomás-változásokat detektálják (poszturális szisztolés-esés és a diasztolés-emelkedés handgrip-teszt során). Az egyes tesztek és azok összesített eredményét (autonóm score), életkorfüggő kategóriákban is megadva, EKG-hoz csatlakoztatott software (Innobase 3.1) segítségével értékeltük. Vibrációérzést az alsó végtagokon 128 Hz-es Riedel-Seiffer kalibrált hangvillával mértük. Albuminuria mérése (nefelometrián) egyszeri vizeletmintából történt és albumin/kreatinin hányadost (ACR) számoltunk. Statisztikai

analízishez nem-paraméteres (Wilcoxon, Mann–Whitney U) és paraméteres (párosítatlan- és párosított-t) tesztek, X^2 -tesztet, Spearman's korrelációt használtunk (SPSS 10.0, SPSS Inc.).

3.3) Az EPO-rezisztenciát keresztmetszeti tanulmányban vizsgáltuk négy, azonos szérumszintű EPO-szinttel bíró csoport összehasonlításával: 1) T2DM-es betegek normális glomeruláris funkcióval (szérumszintű kreatinin: 60–120 $\mu\text{mol/l}$ és GFR: 90–120 ml/perc) [DM; n=15]; 2) T2DM-es betegek nephropathiával (DM+CKD; n=15); 3) nem-diabetikus CKD-s betegek (CKD; n=15); 4) egészséges, életkorban és nemben illesztett egyének (KONTR; n=10). A DM és a DM+CKD csoport nem különbözött a szénhidrátháztartás tekintetében (hemoglobin A_{1c}, fruktózamin, plazma glükóz). Nem volt különbség a szérumszintű kreatinin- és GFR-értékekben a DM+CKD és a CKD, illetve a KONTR és a DM csoportok között. A CKD csoportban szerepelt hypertenzív nephropathia (n=9), krónikus pyelonephritis (n=3), analgetikum nephropathia (n=1), krónikus glomerulonephritis (n=1), policisztás vesebetegség (n=1). A malignitásban, autoimmun-betegségben és hiányállapotban szenvedő anaemiás betegeket kizártuk. Az intervenció fázisban alacsony EPO-szintekkel bíró anaemiás betegek (DM: n=3; DM+CKD: n=4; CKD: n=3) per os 1 gram ASA-t (Aspirin®) kaptak. Kizárási kritériumok voltak: dohányzás, hyperaciditás, fekélybetegség, gasztrointesztinális vérzés, malignitás, krónikus tüdőbetegség. Az éhomi vérvételek az ASA adása előtt és után 4, 8, 24, és 48 óra elteltével történtek. A szérumszintű EPO, reticulocytaszám és -arány, vörösvértest-szám, hematocrit, hemoglobin, és az LDH meghatározása rutin laboratóriumi módszerrel történt. Statisztikai elemzésekhez ANOVA-t (Bonferroni's posthoc teszt), párosítatlan- és párosított t-tesztet, X^2 -tesztet, Pearson's korrelációt használtunk (SPSS 10.0, SPSS Inc.).

EREDMÉNYEK

1. (i) A CFP koncentráció- ($p < 0,05$) és idő-függő módon ($p < 0,05$) növelte mind a P-Ser(1177)-, mind a P-Thr(495)-eNOS szintjét a kezeletlen kontroll-sejtekhez képest; a növekedés maximuma 50%-os CFP esetén volt megfigyelhető 30 perces kezelés után. A P-Thr(495)-eNOS szintje szignifikánsan magasabb volt minden vizsgált CFP-koncentráció és kezelési időtartam esetén ($p < 0,05$ vs. P-Ser(1177)). A CFP-kezelések koncentráció- ($p < 0,05$) és idő-függő módon ($p < 0,05$) vezettek a homodimer eNOS felbomlásához, amit a szignifikánsan csökkent dimer/monomer eNOS hányados értékek jeleztek.

(ii) GSH jelentősen csökkentette a CFP hatására megnövekedett P-Ser(1177)- és P-Thr(495)-eNOS szintjét a GSH-kezeletlen sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$). Az eNOS foszforilációjában bekövetkezett csökkenés kifejezettebb ($p < 0,05$) volt a Thr(495)-oldalláncon (~45%), mint a Ser(1177) helyen (~20%). GSH kivédte a homodimer eNOS disszociációját ($p < 0,05$) és a megtartott dimer/monomer eNOS arányban nem volt különbség a CFP-hatás maximumán (50%, 20 perc) a CFP-kezeletlen kontroll sejtekhez képest (NS).

(iii) A CFP koncentráció- ($p < 0,05$) és időfüggően ($p < 0,05$) gátolta a PKB/Akt-foszforilációját a Ser(473) helyen. A CFP-kezeléshez képest a szelektív PI3-K/Akt-inhibitor (LY-294002) tovább növelte a P-Ser(1177)-eNOS szintjét ($p < 0,05$) és nem befolyásolta a P-Thr(495)-eNOS-szinteket (NS). Szelektív PKA-inhibitorral (H-89) nem találtunk változást a CFP hatására bekövetkező eNOS foszforilációkban sem a Thr(495)-, sem a Ser(1177)-oldalláncon (NS). Szelektív PKC-inhibitor (Ro-318425) szignifikánsan csökkentette a P-Thr(495)-eNOS szintjét minden vizsgált CFP-koncentráció esetén (10%, 20%, 50%; $p < 0,05$), és növelte a P-Ser(1177)-eNOS szintjét 50%-os CFP esetén ($p < 0,05$).

(iv) Izoforma specifikus PKC β II-inhibitor (ruboxistaurin) szignifikánsan csökkentette P-Thr(495)-eNOS-szinteket függetlenül a CFP-kezelések koncentrációjától ($p < 0,05$) és növelte a P-Ser(1177)-eNOS szintjét 50%-os CFP esetén ($p < 0,05$). Ruboxistaurin szignifikánsan növelte a P-Ser(1177)-eNOS/P-Thr(495)-eNOS arányát koncentrációfüggő módon (10 és 20% CFP: $p < 0,05$; 50% CFP: $p < 0,001$).

2. (i) I/R-szívekben a szívfunkciók (LVDP, \pm dP/dt, RPP), UDP-HexNAc- és ATP-szintek jelentős csökkenést, míg a cTnl-szintek növekedést mutattak ($p < 0,05$ vs. Norm); mindez a kardiális O-GlcNAc-szintek ~50%-os csökkenésével járt ($p < 0,05$ vs. Norm). A kiindulási, I/R előtti szívfunkciókban nem volt különbség a reperfúzió során kezeletlen (Control) és kezelt NBt50, NBt100, NAe csoportok között. Az RPP, LVDP és max dP/dt funkciók visszatérése reperfúzió alatt jobb volt a NBt100 és NAe csoportokban ($p < 0,05$ vs. Control); ez a NAe-szívekben 5 perc után és a reperfúzió ideje alatt mindvégig látható volt. A reperfúzió végén az RPP, LVDP és \pm dP/dt értékei magasabbak voltak a NBt100- és NAe-szívekben ($p < 0,05$ vs. Control), és magasabbak voltak a NAe-szívekben mind a NBt50, mind a NBt100 csoporthoz képest ($p < 0,05$). NBt100- és NAe-szívekben jelentősen csökkent a cTnl szintje ($p < 0,05$ vs. Control), és a NAe-szívek cTnl kibocsátása alacsonyabb volt mind a NBt50, mind a NBt100 csoporthoz viszonyítva ($p < 0,05$). Reperfúziós VT és/vagy VF incidenciája 86% volt a

kezeletlen Control szívekben, 14% a NBt50-szívekben, és nem fordult elő sem a NBt100, sem a NAe csoportban ($p < 0,05$). Az UDP-HexNAc- és ATP-szintekben nem volt különbség az I/R csoportok között. A NAG-tiazolinok minden kezelt csoportban (NBt50, NBt100 and NAe) növelték az O-GlcNAc szintjét ($p < 0,001$ vs. *Control*). Az O-GlcNAc-acyláció magasabb volt a NBt100 csoportban ($p < 0,05$ vs. *NBt50*), és magasabb volt NAe-szívekben mind a NBt50, mind a NBt100 csoporthoz képest ($p < 0,05$). Szignifikáns korrelációt találtunk az O-GlcNAc és az RPP ($R^2 = 0,82$; $p < 0,05$), a max dP/dt ($R^2 = 0,77$; $p < 0,05$) és a cTnI ($R^2 = 0,65$; $p < 0,05$), valamint az RPP és a cTnI ($R^2 = 0,83$; $p < 0,05$) között.

(ii) Normoxiás szívekben az O-GlcNAc intenzív immunfluoreszcenciát mutatott a kardiomiociták sejtmagjában, a citoszolban pedig egyértelmű kereszt-csíkozott mintázat látszott. Az iszkémia alig volt hatással az O-GlcNAc festődésére, változatlan maradt a citoszolban a csíkozott elrendeződés is, azonban prominens változásokhoz vezetett a nukleáris O-GlcNAc eloszlásában (puktátumok és egyébként O-GlcNAc-negatív sejtmagok perinukleáris festődésű megjelenésével). Az I/R-szívekben az O-GlcNAc fluoreszcenciája lecsökkent mind a citoszolban, mind a sejtmagban, és a csíkozott mintázat jelentős vesztesét láttuk, a nukleáris O-GlcNAc-festődésbeli eltérések, hasonlóan az iszkémiás szívekhez, itt is szembetűnőek voltak. Az NBt50-perfúzió az O-GlcNAc fluoreszcenciáját fokozta, a citoszolban megőrizte az O-GlcNAc kereszt-csíkozott mintázatát a kezeletlen I/R-szívekhez képest, azonban a sejtmag O-GlcNAc festődése gyenge maradt, valamint a puktátumok és perinukleáris O-GlcNAc-festődések továbbra is jelen voltak. Immunblot vizsgálatokban Az I/R az O-GlcNAc-szintekben ~50%-os csökkenést eredményezett mind a sejtmag, mind a citoszol frakcióban ($p < 0,05$ vs. *Norm*). Az NBt50-perfúzió növelte az O-GlcNAc szintjét a citoszolban ($p < 0,05$ vs. *Control*), de a sejtmag O-GlcNAc szintjét nem változtatta (*NS*). Az NBt100 és a NAe mindkét frakcióban az O-GlcNAc-szintek növekedését eredményezte ($p < 0,05$ vs. *Control*), azonban a nukleáris O-GlcNAc-szintek növekedése kisebb mértékű volt ($p < 0,05$ vs. *Citoszolikus*). Az I/R az OGT szintjét erősen csökkentette mind a sejtmagban, mind a citoszolikus frakcióban ($p < 0,05$ vs. *Norm*). Az NBt50-, NBt100- és NAe-perfúziók csökkentették az OGT-vesztést a citoszolfrakcióban ($p < 0,05$ vs. *Control*) de nem befolyásolták a sejtmagfrakcióban (*NS*). A citoszolban észlelt nagy molekulásúlyú (150-250 kDa) OGT sávok intenzitásának I/R-okozta növekedését is mérsékelte az NBt50-, NBt100- és NAe-perfúzió ($p < 0,05$ vs. *Control*).

(iii) Azt találtuk, hogy az O-GlcNAc co-lokalizálódik desminnel és vinculinral, amelyek a Z-vonalat alkotó citoskeletális fehérjék közé tartoznak, megerősítvén ezzel, hogy kardiomiocitákban a Z-vonalaknak megfelelő régiók igen gazdagok O-GlcNAc-asszociált fehérjékben. Iszkémia nem okozott szembevető változást a desmin, vagy a vinculin fluoreszcenciájában. Az I/R-szívekben a desmin-fluoreszcencia kifejezett csökkenését és a Z-vonalaktól való diszrupcióját láttuk, míg vinculin festődése és intenzitása viszonylag változatlan maradt. Az NBt50-szívekben a szerkezeti szétesés mértéke nagymértékben csökkent, a desmin és a vinculin csíkozott mintázatú rendezettsége, illetve co-lokalizációjuk O-GlcNAc-val megtartott maradt. Immunblot vizsgálatokban, az I/R a desmin szintjében erős csökkenést okozott, főként a membránfrakcióban ($p < 0,05$ -kal). Az NBt50-, NBt100- és NAe-perfúzió a desmin-vesztést kivédte ($p < 0,05$ vs. *Control*). A total vinculin szintjében egyik csoportban sem volt szignifikáns változás, azonban az NBt50-, NBt100- és NAe-perfúzió megakadályozta a vinculin Tyr(822)-foszforilációjának I/R- okozta növekedését a teljes szöveti lizátumban és a membránfrakcióban is ($p < 0,05$ vs. *Control*).

(iv) Iszkémia (10 perc) növelte az O-GlcNAc és az UDP-HexNAc szintjét ($p < 0,05$ vs. *Normoxia*), míg 60 perces reperfúzió mindkettőt lecsökkentette ($p < 0,05$ vs. *Ischemia*). Az ATP csökkent az ischaemiával ($p < 0,05$ vs. *Normoxia*) és szintje nem állt vissza a reperfúzió után. A MALDI-TOF, amivel olyan fehérjecsoportokat analizáltunk, amelyek iszkémia és/vagy reperfúzió során emelkedett vagy csökkent O-GlcNAc-immunreaktivitást mutattak, három fehérjére utalt. Az iszkémiában növekvő és a reperfúzióval csökkenő O-GlcNAc-szinteket mutató fehérjesávban identifikált két fehérje a GP (glikogén-foszforiláz b; 97 kDa) és az ACO (aconitáz 2; 85 kDa) volt. A harmadik fehérjéhez (vinculin; 125 kDa) tartozó sávban csak reperfúzióban láttunk O-GlcNAc-emelkedést iszkémiához és normoxiához viszonyítva is. A vinculin, a GP és az ACO összfehérje szintjében nem volt különbség az iszkémiás vagy reperfúziós-szívekben. Immunprecipitációval mindhárom fehérje pozitívítást adott anti-O-GlcNAc antitesttel és a stressz kondíciónak megfelelő változásokat mutatták (vinculin reperfúzió utáni O-GlcNAc fokozódását; a GP és az ACO O-GlcNAc fokozódását iszkémiában és csökkenését reperfúzióban). Az NBt100 és a NAe kivédte a vinculin, GP és ACO fehérjék O-GlcNAc-ációjának I/R- okozta csökkenését úgy, hogy nem volt különbség (stressztől és kezelésektől függetlenül) a fehérjék összmenyiségében a szövetlizátumokban, illetve immunprecipitáció után. β -N-acetil-glükózaminnal történő inkubáció az anti-O-GlcNAc antitest kötődésének teljes fokú gátlását okozta. Vinculin,

GP és ACO co-immunprecipitálódott OGT-vel. Az NBt100 és a NAe kivédte a mitokondriális ACO és OGT szintjének és az ACO aktivitásának I/R-okozta csökkenését ($p < 0,05$ vs. *Control*).

3.1. (i) A glükózamin-perfúziók (0,05, 0,1, 1,0, 5,0 és 10,0 mM) nem voltak hatással sem a szívfunkcióra, sem az ATP-szintekre (*NS* vs. *0 mM*). A glükózamin dóziszfüggő módon emelte mind az UDP-GlcNAc, mind az O-GlcNAc szintjét ($p < 0,05$ vs. *0 mM*). Már 0,1 mM glükózamin szignifikánsan növelte (40-50%-kal) az UDP-GlcNAc és O-GlcNAc szintjét ($p < 0,05$ vs. *0 mM*). A glükózamin minden koncentrációban szignifikánsan növelte a palmitát oxidációját ($p < 0,05$ vs. *0 mM*) és egyidejűleg a teljes szénhidrát-oxidációban csökkenéshez vezetett ($p < 0,05$ vs. *0 mM*). A legnagyobb mértékű változást 0,1 mM glükózamin mellett láttuk, ahol a palmitát-oxidáció növekedését (46 ± 4 és 67 ± 2) csökkent laktát-oxidáció (30 ± 3 és 14 ± 1) és csökkent piruvát-oxidáció (8 ± 2 és 3 ± 1) kísérte ($p < 0,05$ vs. *0 mM*). Míg magasabb glükózamin koncentrációk érdemben nem befolyásolták a szubsztrát-felhasználást, az UDP-GlcNAc- és O-GlcNAc-szintek további emelkedést mutattak. A legnagyobb (2-szeres) növekedést 1 mM glükózamin mellett láttuk, amit az 5,0 és 10,0 mM glükózamin koncentrációk már nem fokoztak tovább. A glükóz oxidációja nem változott a glükózamin-perfúziók hatására egyik koncentrációnál sem (*NS* vs. *0 mM*). A laktát-oxidációban észlelt 2-szeres csökkenésnek megfelelően az exogén laktátfelvétel mértéke hozzávetőlegesen a felére csökkent 0,1 mM glükózamin koncentrációnál ($p < 0,05$ vs. *0 mM*), míg 0,1 mM glükózamin nem volt hatással a glikolitikus laktát-kibocsátás mértékére.

(ii) Glükózamin a szívben nem befolyásolta sem az AMPK, sem az ACC foszforilációját, még 0,1 mM glükózamin esetén sem, ahol a palmitát-oxidáció fokozódását láttuk. Ezzel szemben glükózamin (0,1, 1,0, 5,0 és 10,0 mM) dóziszfüggő módon növelte a membrán asszociált FAT/CD36 szintjét ($p < 0,05$ vs. *0 mM*).

(iii) A FAT/CD36 fehérjét immunprecipitáltuk olyan patkányszívек teljes szöveti és membránfrakciós lizátumaiban, ahol az O-GlcNAc-ációt közel 3-szorosára növeltük glükózamin és NBt (OGA-gátló) együttes adásával 60 perces normoxiás perfúzió során. Nemcsak a FAT/CD36 fehérje O-GlcNAc-módosulását találtuk, ami különösen a membránfrakcióban volt nyilvánvaló, hanem annak OGT-vel való asszociációját is.

3.2. (i) Az autonóm score korrelációt mutatott a T2DM-tartammal ($r = 0,270$, $p < 0,05$). A vibrációs küszöbérték fordított összefüggést mutatott a fruktózamin szintjével ($r = -$

0,317, $p < 0,05$) és az autonóm score-val ($r = -0,195$, $p < 0,05$), viszont a hemoglobin A_{1c}-vel ($r = -0,179$, $p = 0,172$), vagy a T2DM-tartammal ($r = -0,027$, $p = 0,330$) nem korrelált.

A PF-PPS infúziókat a betegek jól tolerálták, káros mellékhatást vagy infúziós szövődeményt nem észleltünk. A PF-PPS-kezelés csökkentette az autonóm score-t a Verum csoportban ($3,8 \pm 0,2$ és $2,8 \pm 0,2$; $p < 0,001$). A PF-PPS után jelentősen csökkent azoknak a betegeknek a száma, akik terápia előtt enyhe ($n = 36$), mérsékelt ($n = 37$), vagy kifejezett ($n = 3$) károsodást mutattak, és az autonóm score normalizálódott (károsodás nélküli kategória) 20 beteg esetén ($p < 0,001$). A PF-PPS javította a mélylégzési hányadosot a Verum csoportban ($13,9 \pm 1,5$ és $18,2 \pm 1,7$; $p < 0,001$). Azoknak a betegeknek a száma, akik terápia előtt kóros mélylégzési tesztet mutattak ($n = 47$) jelentősen (23,3%-kal) csökkent a PF-PPS-infúziók után ($n = 29$) ($p < 0,001$). A PF-PPS növelte a diasztolés vérnyomás-emelkedést a handgrip teszt során a Verum csoportban (10 ± 1 és 14 ± 1 (Hgmm); $p < 0,001$). Azoknak a betegeknek a száma, akiknek terápia előtt kóros volt a handgrip tesztre adott válaszuk ($n = 48$) jelentősen (29,9%-kal) csökkent a PF-PPS infúziók után ($n = 25$) ($p < 0,001$). A PF-PPS-kezelés nem befolyásolta az egyéb standard reflex-teszt (Valsalva, 30/15 hányados, poszturális vérnyomás-esés) eredményét. A Placebo csoportban ál-infúziókat követően nem volt változás egyik autonóm teszt eredményében sem. A betegcsoportokban nem volt különbség a kóros reflexeket mutató betegek arányában infúziók adása előtt [(Verum/Placebo) mélylégzési hányados: 47/9; Valsalva hányados: 5/1; 30/15 hányados: 1/0; poszturális hypotenzió: 9/3; handgrip teszt: 48/4]. Szintén nem volt különbség az infúziók előtti (pE) és utáni (pU) mélylégzési hányados (pE=0,543; pU=0,063), Valsalva hányados (pE=0,805; pU=0,227), 30/15 hányados (pE=0,339; pU=0,718), poszturális hypotenzió (pE=0,199; pU=0,052), diasztolés vérnyomás-emelkedés (pE=0,227; pU=0,087) értékeiben a két betegcsoport között. Amíg az infúziók előtti autonóm score értékben nem volt különbség a Verum és Placebo csoportok között ($3,8 \pm 0,2$ és $3,9 \pm 0,5$; pE=0,673), addig infúziók után az alacsonyabb volt a Verum csoportban ($2,8 \pm 0,2$ és $4,5 \pm 0,5$; pU<0,001 vs. Placebo).

A PF-PPS növelte a vibrációs küszöbértéket a Verum csoportban ($10,5 \pm 0,4$ és $11,9 \pm 0,4$; $p < 0,001$), míg a Placebo csoportban nem változott ($11,6 \pm 1,2$ és $10,7 \pm 1,2$) ál-infúziók után. A betegcsoportok között nem volt különbség sem a kiindulási, sem az infúziók utáni, egyik alsó végtagon mért értékekben sem (jobb: pE=0,157, pU=0,571; bal: pE=0,272, pU=0,671).

(ii) A betegek többsége normalalbuminuriásnak bizonyult a Verum (n=47; 70%) és a Placebo csoportban (n=9; 82%) is. Az ACR (mg/mM) értéke nem változott a PF-PPS-infúziók után a Verum csoportban ($3,5\pm 1,4$ és $4,3\pm 1,3$; $p=0,364$), sem a Placebo csoportban az ál-infúziók után ($6,39\pm 4,71$ és $9,34\pm 8,22$; $p=0,436$). A betegcsoportok ACR értékei nem különböztek az infúziók előtt ($pE=0,449$) vagy után ($pU=0,278$).

3.3. (i) Vizsgálati csoportok között (DM, DM+CKD, CKD, és KONTR) nem volt különbség az EPO szintjében, nemben, életkorban, lipidekben, vérnyomásértékekben. Nem volt különbség a vesefunkció-romlás mértékében a DM+CKD és CKD csoportok között (kreatinin: $p=0,795$; GFR: $p=0,820$), illetve a szénhidrát-háztartásban a DM és DM+CKD csoportok között (fruktózamin: $p=0,797$; hemoglobin A_{1c}: $p=0,298$). A T2DM időtartama hosszabb volt a DM+CKD csoportban a DM csoporthoz képest (20 ± 3 és 13 ± 2 év, $p<0,05$). Az ACE-I-kezelések aránya nem tért el a beteg-csoportokban.

Azonos szérumszintek mellett, a hematocrit- és hemoglobin-értékek alacsonyabbak voltak a DM, DM+CKD, és CKD csoportokban ($p<0,05$ vs. KONTR). A DM+CKD betegekben találtuk a legalacsonyabb hematocrit- és hemoglobin-értékeket, amelyek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a szénhidrát-háztartásban illesztett DM betegekhez képest ($p<0,05$), és az azonos vese-károsodással bíró DM+CKD betegekhez képest is ($p<0,05$). A vörösvértest-tulajdonságok normál tartományban voltak és nem különböztek a csoportokban. Korrelációs elemzésekkel egyik csoportban sem találtunk összefüggést az EPO-szintek és a hematocrit [DM: $R^2=0,025$, $p=0,575$; DM+CKD: $R^2=0,106$, $p=0,236$; CKD: $R^2=0,000$, $p=0,949$], illetve a hemoglobin között [DM: $R^2=0,000$, $p=0,956$; DM+CKD: $R^2=0,100$, $p=0,316$; CKD: $R^2=0,000$, $p=0,960$]. A korrekciók során (kor, kreatinin, hemoglobin A_{1c}, fruktózamin, szérumszén-glükóz, total és HDL-koleszterin, vérnyomás változókat vizsgálva) csak a DM csoportban találtunk összefüggést az EPO-szintek és a hematocrit között BMI-re ($R^2=0,410$, $p<0,05$) és trigliceridre ($R^2=0,285$, $p<0,05$) történt korrekciók után.

(ii) Alacsony szérumszintű EPO-jú anaemiás betegekben a nagy-dózisban adott ASA 59%-kal növelte az EPO szintjét ($7,71\pm 5,41$ és $12,26\pm 8,73$), 33%-kal a reticulocytaszámot (42 ± 12 és 56 ± 16), 14%-kal a reticulocytarányt ($0,81\pm 0,49$ és $0,92\pm 0,68$), 7%-kal a vörösvértest-számot ($3,75\pm 0,26$ és $4,01\pm 0,29$), 6%-kal a hemoglobint ($111,1\pm 7,6$ és $118,3\pm 8,6$) és 8%-kal a hematocritot ($33,0\pm 2,6$ és $35,8\pm 2,6$) ($p<0,01$). Az ASA ugyanakkor 12%-kal csökkentette az LDH-t (319 ± 36 és 280 ± 35 ; $p<0,01$).

MEGBESZÉLÉS

1. (i) Kimutattuk, hogy a rövid idejű cigarettafüst-kezelés endotélisejtekben növeli az eNOS foszforilációs módosulását és annak gátló irányba történő eltolódását okozza, továbbá fokozza a katalitikusan aktív dimer eNOS szétesését. Eredményeink alátámasztják azt a tényt, hogy a cigarettafüst csökkent eNOS aktivitáshoz, ezáltal az NO csökkent biológiai hozzáférhetőségéhez vezet, amely fontos tényező a makro- és mikrovaszkuláris betegségek progressziójában. A CFP növelte az eNOS-foszforilációt mind a serkentő Ser(1177)-, mind a gátló Thr(495)-helyen. Ez ellentmond annak a szemléletnek, amely szerint ezeken a reziduumokon egyidőben reciprok jellegű foszforiláció-defoszforiláció zajlik. Másrészt elképzelhető, hogy cigarettafüst hatására egymástól független 'upstream' szabályozó tényezők aktiválódnak és vezetnek egyidejűleg mindkét eNOS-oldallánc megnövekedett foszforilációjához.

(ii) Kimutattuk, hogy GSH (potens szabadgyök- és aldehid-fogó antioxidáns) kivédi az eNOS cigarettafüst indukálta inaktíváló módosulásait, megelőzve egyrészt annak gátló foszforilációját, másrészt homodimer formájának disszociációját egy inaktív állapotú, főként szuperoxid-gyököt termelő monomer formává. Ezáltal a GSH jótékonyak tűnik az eNOS-aktivitás és NO-termelés megőrzésében, feltehetően az aldehideket semlegesítő hatása révén, melyek különösen nagy mennyiségben (főként a formaldehid) vannak jelen a CFP-ben (Mazák és mtsai.). A CFP kiváltotta oxidáns stressz eNOS-foszforilációkra gyakorolt hatásában felvetődik továbbá az aldehidek közvetítő szerepe, és az is, hogy a homodimer eNOS konzerválásában fontos tényező az eNOS-tiolcsoportok oxidatív károsodásának kivédése.

(iii) Számos proteinkináz szerepe jól ismert az eNOS-aktivitás különböző hatásokra bekövetkező szabályozásában. Például fiziológias körülmények között (nyíróerők, bradykinin) a PKB/Akt és a PKA is képes az eNOS-t aktiválni Ser(1177)-foszforilációval, így az NO-termelést fokozni. A CFP koncentráció- és időfüggően okozta a PKB/Akt inaktivációját, továbbá CFP hatására a P-Ser(473)-Akt és a P-Ser(1177)-eNOS szintjének ellentétes változását láttuk, és az utóbbi további növekedést mutatott szelektív PI3-K-inhibitor kezelés során. Így megállapítható, hogy PI3-K/PKB/Akt jelátviteli út nem lehet felelős a CFP hatására létrejött Ser(1177)-foszforilációért. Szelektív PKA-inhibitor (H-89) nem befolyásolta a CFP hatására bekövetkező eNOS-foszforilációt egyik oldalláncon sem, így a CFP eNOS-foszforilációra gyakorolt hatása szintén függetlennek bizonyult a PKA jelátviteli úttól.

(iv) A PKC jelátviteli út, amely szerteágazó celluláris hatások közvetítésében vesz részt, szintén szerepet játszik az eNOS-aktivitás szabályozásában a Thr(495)-foszforiláció fenntartásával, melyet ezidáig csak nem-stimulált endotélsejtekben mutattak ki. A PKC, különösen a PKC β II altípus aktivációjának szerepet tulajdonítanak a diabetes vaszkuláris-endoteliális diszfunkciót előidéző hatásának mediálásában, míg ruboxistaurin (PKC β II-inhibitor) megelőzte ezeknek a szövődményeknek a kialakulását és megőrizte az endotél-függő vazodilatációt. A PKC-út gátlásával (Ro-318425) azt találtuk, hogy jelentősen csökkent a CFP hatására megnövekedett Thr(495)-foszforiláció és ruboxistaurin, hasonlóan a szelektív PKC-inhibitor hatásához, koncentrációfüggő módon csökkentette a P-Thr(495)-eNOS szintjét. Elmondható, hogy a PKC-, azon belül is a PKC β II-aktivációnak kulcsszerepe lehet a cigarettafüst hatására létrejövő eNOS-foszforilációk közvetítésében, valószínűbb, hogy a gátló Thr(495)-foszforiláció fokozásán, mint a serkentő Ser(1177)-foszforiláció növelésén keresztül. A PKC β II gátlása ruboxistaurinnal ígéretes stratégiának tűnik a cigarettafüst okozta káros hatások kivédésében.

2. (i) Kimutattuk, hogy a NAG-tiazolinok, melyek nagyobb szelektivitású OGA-gátlók, mint a PUGNAc, szintén védőhatásúak az izolált szív I/R károsodásával szemben. Reperfúzió során javították a szív teljesítményét, csökkentették pro-arritmiás aktivitását és a szöveti károsodást. A NAG-tiazolinok dózisfüggő módon növelték a szívben az O-GlcNAc szintjét és a protekció mértéke arányban állt a szerek O-GlcNAc-szintet fokozó hatásával (NAe > NBt azonos koncentrációknál). A szívfunkciók javulása és a szöveti károsodás csökkenése nem a bioenergetikai állapot javulásának vagy a HBP fokozódásának a következtében jött létre, mivel a NAG-tiazolinok nem befolyásolták az ATP- és UDP-HexNAc-szinteket. Szignifikáns korreláció az O-GlcNAc-szintek növekedése és a szívteljesítmény javulása, illetve a szöveti károsodás csökkenése között szintén arra utal, hogy az OGA-gátlás mértéke szoros összefüggést mutat a protekció mértékével, így elmondható, hogy a NAG-tiazolinok kardioprotektív hatása a megnövekedett fehérje O-GlcNAc-izációon keresztül érvényesült. Mindezt a reperfúzió ideje alatt történő alkalmazással láttuk és már 5 perc után bekövetkezett a szívfunkciók javulása, aminek potenciálisan olyan helyzetekben lehet klinikai jelentősége, ahol a nagyon korai revaszkularizációs kezelési eljárások praktikusak. Az O-GlcNAc fokozása NAG-tiazolinokkal hasznos kardioprotektív stratégiának tűnik, jóllehet esetleges használhatóságuk I/R károsodással szemben *in vivo* még tisztázandó.

(ii) Immunhisztokémiával kimutattuk, hogy normoxiás szívekben magasabb O-GlcNAc-szint található a kardiomiociták sejtmagjában, hasonlóan egyéb sejttípusokhoz; valamint a citoszolban a Z-vonalaknak megfelelően, kereszt-csíkozott elrendeződésben. Elsőként demonstráltuk, hogy a Z-vonalbeli fehérjék gazdagok O-GlcNAc módosulásban; figyelembe véve a Z-fehérjék fontosságát a hemodinamikai és mechanikai ingerek közvetítésében és így a kardiomiocita-funkciók szabályozásában, a kardioprotektív hatásokon túlmenően a fehérje O-GlcNAciláció még nagyobb jelentőséggel bírhat a szívben. Iszkémia és I/R a sejtmagokon belül az O-GlcNAc csökkenését eredményezte annak pontszerű és perinukleáris halmozódása mellett, tehát az iszkémia és I/R okozta hatások egyik következménye a citoszolban és sejtmagban található kardiális O-GlcNAc-szintek redisztribúciója. Míg az OGA-gátlás megakadályozta az I/R során bekövetkező O-GlcNAc-vesztést és a szerkezetbeli károsodást (szétroncsolt myofibrillaris és kereszt-csíkozott O-GlcNAc struktúra), addig az iszkémia és I/R indukálta nukleáris O-GlcNAciláció csökkenésére (i.e. O-GlcNAc negatív sejtmagok) nem volt hatással. Immunblot vizsgálatok szintén azt mutatták, hogy az NBt- és a NAe-szívekben a sejtmag O-GlcNAc szintjének emelkedése elmaradt a citoszol szintjéhez képest, ami persze azt is tükrözheti, hogy az OGA túlnyomórészt (~90%) a citoszolban lokalizálódik.

(iii) Kimutattuk az O-GlcNAc co-lokalizációját két Z-vonal asszociált citoskeletális fehérjével, desminnel és vinculinval. Kimutattuk, hogy az OGA-gátlás kivédte az I/R okozta desminvesztést és annak disszociációját a Z-vonalaktól. I/R során az NBt és a NAe nagyban megakadályozta a desmin szintjének csökkenését teljes és főként a membránfrakciós szívlizátumokban. A desminnek fontos szerepe van a szerkezeti egység és kontraktilitás megőrzésében, ily módon reperfüzió során az OGA-gátlók desmin megőrzésére kifejtett hatása hozzájárulhat a szívfunkciók javulásához és a szöveti károsodás csökkenéséhez. Míg korábbi vizsgálatokban leírták a vinculin csökkenését és/vagy megváltozott szubcelluláris lokalizációját I/R során, addig a vinculin szintjében nem találtunk változást, csak néhány apróbb eltérést a fluoreszcenciájában (diszlokált Z-vonalak, nagyobb intenzitás az interkalált lemezekben), és a Z-vonalakhoz és az interkalált lemezekhez való viszonya is relatíve sértetlen maradt. Ezzel szemben azt találtuk, hogy az OGA-gátlás mérsékelte a vinculin I/R során megnövekedett Tyr(822) foszforilációját. A vinculin foszforilációjának fiziológias következményeiről a szívben keveset tudunk. A fokális adhézions komplexek és az interakciós fehérjék (pl. vinculin) szétesése súlyosbítja a szívizomsejtek I/R

károsodását. Elképzelhető, hogy OGA-gátlók hatására a vinculin-foszforiláció csökkenése I/R során szerepet játszhat a fokális adhézis komplexek fenntartásában. A vinculinról sikerült kimutatnunk, hogy OGT-hez asszociáltan fordul elő és O-GlcNAcilálódik. A továbbiakban tisztázandó, hogy a vinculin O-GlcNAciláció/foszforiláció-ja miként befolyásolja funkcionálisan a szív I/R választ.

(iv) Kimutattuk, hogy amíg a rövid, 10 perces iszkémia fokozza az O-GlcNAc szintjét, addig I/R jelentősen csökkenti az O-GlcNAcilációt a szívben. Ez ellentétesnek tűnik azzal a nézettel, mely szerint az O-GlcNAc növekedése a sejtek endogén, stressz-aktiválta válaszreakciója (Zachara és mtsai.). Az I/R során kialakuló O-GlcNAc-csökkenés oka nem ismert. Fülöp és mtsai. is azt találták, hogy iszkémiával nőtt, reperfúzió során viszont csökkent az O-GlcNAc szintje izolált szívekben. Nőt és mtsai. hasonló jelenséget észleltek *in vivo* kivérzéses shock-ot követően, ahol újraélesztés után 24 óra múlva is fennállt a szövetek csökkent O-GlcNAcilációja. H₂O₂-kezelés kardiomiocitákban ugyancsak az O-GlcNAc csökkenéséhez vezetett, amit az OGA-gátló PUGNAc kivédett (Jones és mtsai.). Ezek alapján feltételezhető, hogy az oxidatív stressznek, ami a reperfúzió, resuscitáció, vagy H₂O₂-kezelés velejárója szerepe lehet a gátolt O-GlcNAciláció létrejöttében. Az I/R jelentősen csökkentette az aktív OGT (110 kDa) szintjét teljes szövetlizátumban és az egyes szubcelluláris frakciókban (sejtmag, mitokondriális, citoszol), melyek közül a citoszolfrakcióban nagy molekulású OGT-immunreaktív sávokat (150-250 kDa) is láttunk. Az NBt és a NAe nemcsak az aktív OGT csökkenését mérsékelte, hanem a nagy molekulású OGT-k intenzitását is csökkentette, amelyek inaktív OGT-aggregátumok, vagy -multimerek lehetnek; azonban nem kizárt az OGT poszttranszlációs módosulása sem (~140-150 kDa sáv alapján) talán a ROS okozta károsodásának következtében.

Kimutattuk, hogy iszkémia és/vagy I/R változást okozott bizonyos célfehérjék úgy, mint GP, ACO és vinculin O-GlcNAcilációs módosulásában és hogy ezen fehérjék O-GlcNAcilációja növelhető volt NAG-tiazolinokkal, azonban pontosan nem tudjuk, hogy ezek hogyan járultak hozzá a kardioprotekcióhoz. Figyelembe véve, hogy rengeteg fehérje képes O-GlcNAcilálódni, nem valószínű, hogy egyetlen fehérje O-GlcNAc módosulása lenne felelős az I/R károsodás elleni védőhatás létrejöttéért.

A NAG-tiazolinok és az O-GlcNAciláció fokozódásával kapcsolatos kardioprotekció pontos mechanizmusát nem ismerjük. Az NBt- és NAe-szívekben már a reperfúzió kezdetén, 5-10 percen belül javultak a szívfunkciók, ami transzkripciótól eltérő mechanizmust valószínűsít. A reperfúziós károsodás velejárói a felborult Ca²⁺-

háztartás, a fokozott oxidatív stressz és a mitokondriális diszfunkció. Izolált szívekben az O-GlcNAc fokozása csökkentette a Ca^{2+} -paradox okozta Ca^{2+} -túlterhelést és mérsékelte I/R során a Ca^{2+} -érzékeny proteázok aktivitását (Liu és mtsai.). A NAG-tiazolinok reperfúzió során kivédtek a desmin csökkenését, ami igen érzékeny a Ca^{2+} -aktivált proteázokkal szemben, így lehet, hogy demin proteolysisét gátolták. Az NBt- és NAe-szívek csökkent arritmias aktivitását és az LVDP javulását eredményezhette a citoszol és mitokondriális Ca^{2+} -szintek gyors normalizálódása. A fokozott O-GlcNAc a mitokondriális stabilitás fokozásával kivédte a kardiomiociták letális ROS károsodását (Jones és mtsai.). Az NBt kardiomiocitákban csökkentette az apoptózist és nekrozist I/R során, továbbá mérsékelte a H_2O_2 indukálta mitokondriális membrán potenciál csökkenését (Champattanachai és mtsai.). Kimutattuk, hogy az NBt és a NAe kivédte az aconitáz-aktivitás csökkenését, melyről jól ismert, hogy ROS által érzékenyen inaktiválódik, valamint növelte annak mitokondriális szintjét és asszociációját O-GlcNAc-val és OGT-vel. Összefoglalva, lehetséges, hogy a NAG-tiazolinok I/R-val szembeni miokardiális védőhatása csökkent Ca^{2+} -túlterhelés és/vagy oxidatív stressz miatt jön létre. Az oxidatív stressz és az O-GlcNAc közti összefüggések alapján feltételezhető, hogy az O-GlcNAciláció egy olyan redox-érzékelő jelátviteli út, aminek lényeges szerepe van a ROS-ra adott válaszreakciókban, így befolyásolni képes a szívek I/R stressz-el szembeni toleranciáját is.

3.1. (i) Kimutattuk, hogy a HBP akut (60 min) aktivációja glükózámmal, amely dóziszfüggően növelte az izolált szívek UDP-GlcNAc és O-GlcNAc szintjét, a zsírsav-oxidáció jelentős növekedését és a teljes szénhidrát-felhasználás egyidejű csökkenését eredményezte, hasonlóan a diabeteses szívre jellemző anyagcsere-változáshoz. A csökkent szénhidrát-oxidációt főként a laktát, és kisebb mértékben a piruvát csökkent oxidációja okozta, míg a glükóz oxidációja nem változott. A kardiális szubsztrát-felhasználás ezirányú változása megegyezik a hasonló körülmények között perfundált ZDF-patkányszívekben leírtakkal (Wang és mtsai.), ahol a T2DM fellépése megnövekedett zsírsav- és csökkent szénhidrát-oxidációval (főleg a laktáté), valamint a szívkontrakciók zavarával is társult. Vizsgálatunkban károsodott szívfunkciót nem láttunk feltehetően a kezelési idő rövidege (60 perc) miatt. Glükózamin nem befolyásolta a glükózból származó laktát-kiáramlást (glikolízist) azt jelezve, hogy a glükózamin a szívben nem a glikolízisen és a TCA-körön keresztül metabolizálódik. A glükózamin szubsztrát-felhasználásra kifejtett hatását viszonylag alacsony (0,1 mM) koncentrációnál láttuk, ahol az UDP-GlcNAc- és az O-GlcNAc-szintek emelkedettek

voltak, ami arra utal hogy a HBP és az O-GlcNAc `turnover` igen csekély mértékű változása is fontos lehet a szívmetabolizmus szabályozásában. Míg magasabb glükózamin-szintek (1-10 mM) nem voltak hatással a szubsztrát-felhasználásra, addig az UDP-GlcNAc- és O-GlcNAc-szintek tovább növekedtek azt jelezve, hogy a glükózamin-metabolizmus fő útvonala a szívben a HBP.

(ii) Az adipocytákkal ellentétben (Luo és mtsai.) a glükózamin a szívben nem okozott AMPK- és ACC-aktivációt, ami magyarázhatná a megnövekedett palmitát-oxidációt. Ugyanakkor a kezelések időtartama (tartós-24 óra és akut-60 perc) és/vagy szövetspecifikus hatások (zsír és szív) befolyásolhatják az AMPK-aktivációt. Nem zárható ki, hogy a HBP és az O-GlcNAc-aktiváció tartós fokozása az AMPK-ACC jelátviteli utat nem aktiválja, aminek meghatározó szerepe van a szív energia és metabolikus homeosztázisában. Azonban kimutattuk, hogy a glükózamin dóziszfüggően növelte a membrán asszociált FAT/CD36 szintjét, ami a szívben a zsírsav-felvétel ~50-80%-ért felelős, így serkentőleg hat a zsírsav-oxidációra. A glükózamin hatására megnövekedett palmitát-oxidáció így részben a megnövekedett FAT/CD36-szintek következménye lehet. A FAT/CD36-szintek emelkedése (maximumát 5-10 mM glükózamin esetén láttuk) és a palmitát-oxidáció növekedése (maximumát 0,1 mM glükózamin esetén láttuk) közti különbség arra utalhat, hogy a zsírsavak a nagymértékben történő sejtbejutáskor főként észterifikálódnak.

(iii) A FAT/CD36 expressziójának növekedését diabetesben összefüggésbe hozzák a miokardiális zsírsav-transzport és -oxidáció növekedésével, illetve a sarcolemma és intracelluláris tárolási kompartmentek közti cserefolyamat zavarával. A FAT/CD36 fehérje O-GlcNAc-módosulását (főleg a membránfrakcióban) és asszociációját láttuk OGT-vel. Elképzelhető, hogy a glükózamin hatására megnövekedett FAT/CD36 membránszintje a fehérje O-GlcNAc módosulásának a következménye, talán a FAT/CD36 `recycling` mechanizmusának blokkolása és annak sarcolemmális túlsúlyba kerülése révén. A glükózamin miokardiális szubsztrát-felhasználásra (palmitát-oxidáció fokozódása) és növekvő membrán asszociált FAT/CD36-szintekre kifejtett hatása nagy valószínűséggel a HBP és az O-GlcNAc-aktivációján keresztül érvényesült. Diabetesben ezen anyagcsereutak tartós aktivációja hozzájárulhat a diabeteses kardiomiopátia kialakulásához.

3.2. (i) Placebo-kontrollált vizsgálatban igazoltuk, hogy a PF-PPS, két keringésjavító és gyulladáscsökkentő szer kombinációja jelentősen javítja a CA-N-t és a vibrációérzést T2DM-es betegekben. Az autonóm score alapján a vizsgált betegek

nagyobb hányada szenvedett CA-N-ban, beleértve a súlyos (53%) és enyhe (40%) eseteket egyaránt. A CA-N összefüggést mutatott T2DM-tartammal és a csökkent vibrációérzéssel, jelezvén, hogy az autonóm neuropathia általánosságban hosszabb diabetes-tartam után lép fel, és hogy a CA-N gyakran együttesen áll fenn egyéb perifériás neuropathiával. Vizsgálatunkban a CA-N paraszimpatikus (károsodott ki/belégzési hányados, 61%) és szimpatikus (kóros handgrip teszt, 62%) funkciókárosodást is magába foglalt, melyek javultak PF-PPS hatására. A többi kardiális reflex-teszt eredményét nem befolyásolta, valószínűleg az alacsonyabb arányban észlelt kóros voltuk miatt (Valsalva: 7%, 30/15: 1%, orthosztatiszikus hypotenzió: 12%). Mindenesetre a PF-PPS infúziók csökkentették az autonóm score-t és növelték az enyhe CA-N-t mutató illetve a CA-N nélküli betegek arányát a Verum csoportban. A vibrációs küszöbérték inverz összefüggést mutatott a fruktózámmal, jelezvén a `rövidebb` hyperglikémiás epizódok szenzoros idegekre gyakorolt károsító hatását. A PF-PPS növelte a vibrációs küszöbértéket, míg a Placebo csoportban változás nem volt. Ezzel egybevégeően a Verum csoportba tartozó betegek tüneteik (főként zibbadás, égő fájdalom) jelentős javulásáról számoltak be, míg a Placebo betegeknél azok változatlanul fennálltak. Specifikus összefüggést nem igazoltunk, azonban PF-PPS az előnyös keringésjavító, gyulladáscsökkentő/antioxidáns hatásai révén járulhat hozzá a CA-N és a vibrációérzés javulásához. A PF-PPS rövidebb (5 napos i.v.) kúrákban történő rendszeres alkalmazása a CA-N és a perifériás szenzoros neuropathia viszonylag olcsó, jól tolerálható kiegészítő kezelését képezheti, elsősorban hospitalizált diabeteses betegek körében.

(ii) Amíg a résztvevő betegek többsége CA-N-t (93%) és kisebb hányada csökkent vibrációérzést (35%) mutatott, addig viszonylag nagy arányban voltak jelen normalalbuminuriások (72%), valószínűleg a RAS-inhibitor-kezelés magas aránya miatt. Vizsgálatunkban a PF-PPS nem volt hatással az albuminuriára, ami ellentétben áll azokkal a korábbi vizsgálatokkal, ahol a PF hatásosan csökkentette T2DM-es nephropathiás betegek proteinuriáját ACE-I és/vagy ARB terápia mellett vagy önmagában. Bár, ezekben a tanulmányokban a PF-t többnyire hosszabb ideig és nagyobb dózisban (400-1200 mg) alkalmazták és főleg előrehaladottabb stádiumú (mikro-, és makroalbuminuria) nephropathiás betegekben. Lehet, hogy a PF csak magasabb tartományban képes a proteinuriát csökkenteni, vagy éppen a kezelési idő rövidege (5 nap) és/vagy alacsony dózisa (100 mg) miatt nem érvényesült hatása.

Multicentrikus, randomizált, jól-tervezett vizsgálatokban kellene bizonyítani a PF és a PPS hatékonyságát a diabeteses mikroangiopátia kezelésében.

3.3. (i) Keresztmetszeti vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a T2DM és a CKD is EPO-rezisztenciát okoz alacsonyabb hematocrit- és hemoglobin-értéket eredményezve. Korrelációs vizsgálatokban az EPO és a hematocrit-, és a hemoglobin-értékek közötti összefüggés hiánya is igazolta az EPO-rezisztencia jelenlétét T2DM-es és CKD-s betegekben. Mindkét állapot együttes fennálltakor (diabeteses nephropathia) nagyobb mértékű volt az EPO-rezisztencia és a normocyter, nem hiány-eredetű (pl. vas, folsav, B₁₂-vitamin) anaemia mértéke. Ez megfelelhet annak, hogy az anaemia hamarabb jelentkezik és súlyosabb mértékű diabeteses CKD-ban, mint nem diabeteses eredetű CKD-ban, így hozzájárulhat az iszkémiás szervkárosodások magasabb kockázatához is. Szignifikáns összefüggés volt az EPO és a hematocrit között T2DM-es betegekben BMI-re és trigliceridre törént korrekció után. A hypertrigliceridémiának és az obezitásnak, melyek szoros összefüggést mutatnak az inzulin-rezisztenciával és a gyulladásos markerek (CRP, TNF- α) felszaporodásával szerepe lehet az EPO-rezisztencia kialakulásában.

(ii) Intervenciós vizsgálatban, a gyulladáscsökkentő és szabadgyök-fogó ASA növelte az EPO szérumszintjét és javította az anaemiát T2DM-es és CKD-s betegekben, alátámasztva ezzel a gyulladásos folyamatok és oxidatív stressz szerepét az EPO hiányának és/vagy hatástalanságának előidézésében. Az ASA rövid időn belül (48 óra) növelte az EPO szintjét és a vörösvértestek időfüggő növekedése (7%) elmaradt a reticulocytaszám növekedésétől (33%), továbbá az LDH-csökkenését (12%) okozta. Az alacsony EPO-szintek miatt kialakuló gyulladásos válaszreakció, a neocytolysis, a fiatal, keringő erythrocyták (neocyták) szelektív pusztulása révén okozhatja a vörösvértestek csökkenését, mely megnövekedett LDH-aktivitással jár. Következésképpen, az ASA gyulladáscsökkentő hatása és az EPO-szintek akut növekedése együttesen a neocytolysis gátlását (neocytosalvation) ezáltal az anaemia javulását eredményezhette. Eredményeink azt is jelzik, hogy a neocytolysis (az alacsony EPO és a fokozott inflammáció következtében) szintén felelős lehet az anaemia kialakulásáért T2DM-es és CKD-s betegekben.

A Ph.D. TÉZISEI

1) A cigarettafüst akutan az eNOS posztranszlációs módosulásaira kifejtett hatásai révén endotél-diszfunkciót okoz az endotélsejtekben.

- A CFP növeli mind az eNOS gátló Thr(495)-foszforilációját, mind a katalitikusan inaktív eNOS monomerek szintjét, amelyek hozzájárulhatnak az NO csökkent biológiai elérhetőségéhez.
- A GSH kivédi a CFP indukálta inaktív eNOS-módosulásokat egyrészt megakadályozva annak gátló foszforilációját, másrészt az eNOS homodimer formájának szétesését, ezáltal hozzájárulhat az eNOS-aktivitás és az NO-termelés megőrzéséhez.
- A CFP hatására megnövekedett eNOS-foszforilációk függetlennek bizonyulnak a PI3-K/Akt úttól, míg a PKC/PKCβII jelátviteli út tűnik felelősnek a gátló Thr(495)-foszforiláció fokozódásáért. PKCβII gátlása ígéretes stratégiának tűnik a cigarettafüst okozta káros hatások kivédésében.

2) A fehérjék O-GlcNAcilációjának a fokozása NAG-tiazolinokkal hatásos kardioprotektív stratégia az izolált szív iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásával szemben.

- Az OGA szelektív gátlása reperfúzió során NAG-tiazolinokkal O-GlcNAc-függő módon javítja az izolált szív funkcionális teljesítményét és csökkenti a szöveti károsodást.
- Reperfúziós károsodás oxidatív stressz-el társulva csökkenti az O-GlcNAc és az OGT szintjét a szívben és ezek kivédhetők NAG-tiazolinokkal.
- A sejtmagban és a Z-vonal régiókban található miokardiális fehérjék gazdagok O-GlcNAc módosulásban, míg az iszkémia és I/R a szívben a sejtmagban és a citoszolban található O-GlcNAc-asszociált fehérjék átrendeződéséhez vezet.
- Az OGA szelektív gátlása NAG-tiazolinokkal reperfúzió során segít megőrizni a miokardium szerkezeti épségét és O-GlcNAc-függő módon csökkenti a Z-vonal fehérjeiben az I/R hatására bekövetkezett eltéréseket.

3) A hexózamin bioszintézis út (HBP) és a fehérje O-GlcNAciláció aktivációja egy új típusú mechanizmus a szívmetabolizmus szabályozásában.

- A HBP és a fehérje O-GlcNAciláció aktiválása glükózzal az intakt szívben a zsírsav-felhasználás növekedését és egyidejűleg a szénhidrát-oxidáció csökkenését eredményezi, hasonlóan a diabeteses szívre jellemző változásokhoz.
- A glükózamin hatására megváltozott szubsztrát-felhasználás a szívben nem kapcsolódik az AMPK vagy ACC aktivációjához.
- A zsírsav-oxidáció fokozódását a membrán asszociált FAT/CD36 szintjének növekedése okozhatja, amiben a FAT/CD36 fokozott O-GlcNAc módosulása is szerepet játszhat.

4) A kombinációs pentoxifyllin (PF) és pentozán poliszulfát (PPS) infúziós kezelés hatékony a kardiovaszkuláris autonóm neuropathia (CA-N) és perifériás szenzoros neuropathia javításában 2-es típusú diabeteses betegekben.

- Rövidtávú infúziós kezelés két keringésjavító és gyulladáscsökkentő szer, a PF-PPS kombinációjával javítja a CA-N-t és a vibrációérzést T2DM-es betegekben.
- A PF-PPS ellenben nem befolyásolja az albuminuriát a normál tartományban.

5) Az acetil-szalicilsav (ASA) növeli az EPO szerumszintjét és javítja az anaémiát T2DM-ben és krónikus vesebetegségben (CKD) szenvedő betegekben.

- A T2DM és a CKD is EPO-rezisztenciát okoz és nagyobb az EPO-rezisztencia és az anaemia mértéke mindkét állapot együttes fennálltakor diabeteses nephropathiában.
- A gyulladáscsökkentő és hydroxil szabadgyök-fogó hatású ASA-kezelés javítja a T2DM-es és CKD-s betegek alacsony szérumszintű EPO szintjét és anaemiáját, részben a neocytolysis gátlásán keresztül.

A Ph.D. ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. Wittmann I., Molnár G.A., Degrell P., Wagner Z., Tamaskó M., **Laczy B.**, Brasnyó P., Wagner L., Nagy J.: Prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 68(S1): S36-42 (2005) **IF: 1.236**
2. Wittmann I., Molnár G.A., Wagner L., Kőszegi T., Wagner Z., **Laczy B.**, Tamaskó M., Markó L., Mohás M., Nagy J.: 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. *Acta Physiologia Hungarica* 94(1-2): 159-166 (2007) **IF: 0.453**
3. **Laczy B.***, Wagner L.*, Tamaskó M., Mazák I., Markó L., Molnár G.A., Wagner Z., Mohás M., Cseh J., Fekete A., Wittmann I.: Cigarette smoke-induced alterations in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation: Role of protein kinase C. *Endothelium* 14(4): 245-255 (2007) **IF: 1.740**
4. **Laczy B.**, Cseh J., Mohás M., Markó L., Tamaskó M., Kőszegi T., Molnár G.A., Wagner Z., Wagner L., Wittmann I.: Effects of pentoxifylline and pentosan polysulphate combination therapy on diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica* 46(2): 105-111 (2009) **IF: 1.549**
5. **Laczy B.**, Hill B.G., Wang K., Paterson A.J., White C.R., Darley-Usmar V., Oparil S., Chatham J.C.: Protein O-GlcNAcylation: A new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(1): H13-28 (2009) **IF: 3.712**
6. **Laczy B.**, Marsh S.A., Brocks C.A., Wittmann I., Chatham J.C.: Inhibition of O-GlcNAcase in perfused rat hearts by NAG-thiazolines at the time of reperfusion is cardioprotective in an O-GlcNAc dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1715-H1727 (2010) **IF: 3.712** (in 2009)
7. **Laczy B.***, Fülöp N.*, Onay-Besikci A., Des Rosiers C., Marchase R.B., Chatham J.C.: Acute regulation of cardiac metabolism by the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation. *PLoS One* 6(4): e18417 (2011) **IF: 4.351** (in 2009)
8. **Laczy B.**, Molnár G.A., Kőszegi T., Wagner L., Wagner Z., Tamaskó M., Markó L., Mohás M., Wittmann I.: Az acetil-szalícilsav egyszeri, nagy dózisban javítja az anaemiát 2-es típusú diabetes mellitusban és krónikus veseelégtelenségben a neocytolysis gátlásán keresztül. *Magyar Belorvosi Archivum* 61: 274-280 (2006)
9. 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 diabéteszes mikrovaskuláris szövődmények kezelésében. *Diabetologia Hungarica* 14(S4):13-18 (2006)
10. **Laczy B.**, Markó L., Tamaskó M., Cseh J., Kőszegi T., Wagner L., Wagner Z., Molnár G.A., Mohás M., Wittmann I.: A pentoxifylline és pentosan polysulphate kombinációs kezelés hatása a diabéteszes neuropathiára és az albuminuriára 2-es típusú diabetes mellitusban. *Diabetologia Hungarica* 15(1): 21-29 (2007)
11. **Laczy B.***, Wagner L.*, Cseh J., Tamaskó M., Mazák I., Markó L., Molnár G.A., Wagner Z., Mohás M., Fekete A., Wittmann I.: Cigarettafüst okozta elváltozások az endothéliejtekben. *Hypertonia es Nephrologia* 14(3): 153-58 (2010)

VÁLOGATOTT ABSZTRAKTOK

1. Tamaskó M., Molnár G.A., **Laczy B.**, Wagner Z., Wagner L., Kőszegi T., Kocsis B., Mazák I., Nagy J., Wittmann I.: Anemia caused by oxidative stress in type 2 diabetes mellitus and azotemia might be decreased by the free radical scavenger acetylsalicylic acid. *Nephrology Dialysis Transplantation* 20 (S4): iv267 (2005) **IF: 2.976**; XLII ERA-EDTA Congress, Istanbul, Turkey, June 2005
2. **Laczy B.***, Wagner L.*, Tamaskó M., Mazák I., Markó L., Molnár G., Wagner Z., Mohás M., Cseh J., Fekete A., Wittmann I.: The effect of cigarette smoke on the phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinase C. *Nephrology Dialysis and Transplantation* 22 (S6): 243-244 (2007) **IF: 3.167**; XLIV ERA-EDTA Congress, Barcelona, Spain, June 2007
3. **Laczy B.**, Wilson L., Brocks C.A., Marchase R.B., Chatham J.C.: Effect of ischemia-reperfusion on O-GlcNAcylation of specific proteins in isolated rat hearts. *FASEB J* (22): 750.16 (2008) **IF: 6.721**; Experimental Biology, San Diego, CA, April 2008
4. **Laczy B.**, Marsh S.A., Brocks C.A., Marchase R.B., Chatham J.C.: Inhibition of O-GlcNAcase in perfused rat hearts by NAG-thiazolines at the time of reperfusion is cardioprotective in an O-GlcNAc dependent manner. *FASEB J* (23): 793.14 (2009) **IF: 6.791**; Experimental Biology, New Orleans, LA, April 2009
5. **Laczy B.**, Marsh S.A., Marchase R.B., Chatham J.C.: O-linked- β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) mediated ischemic cardioprotection associated with increased O-GlcNAcylation of cytoskeletal Z-line proteins. *Circulation Research* 105: e10-53 (2009) **IF: 9.214**; Basic Cardiovascular Sciences Conference, Lake Las Vegas, NV, July 2009
6. Chatham J.C., Zou L., Nót L.G., **Laczy B.**, Marchase R.B.: Protein O-GlcNAcylation: A critical regulator of the cellular response to stress. *Glycobiology* 19(11): 1300 (2009) **IF: 3.929**; Annual Conference of the Society for Glycobiology, San Diego, CA, November 2009
7. Fülöp N.*, **Laczy B.***, Onay-Besikci A., Des Rosiers C., Marchase R.B., Chatham J.C.: Glucosamine increases hexosamine biosynthesis and O-linked N-acetylglucosamine in the heart, and leads to metabolic alterations similar to those seen in diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 52 (Suppl1): S15 (2009) **IF: 6.551**; 45th EASD Annual Meeting, Vienna, Austria, September 2009

(* szerzők egyenlően járultak hozzá a munkához)

A Ph.D értekezéshez kapcsolódó (felsorolt) közlemények összesített impakt faktora: 16.753; összesített szerzői impakt faktor (absztraktok nélkül): 33.782

A Ph.D értekezéshez kapcsolódó (felsorolt) absztraktok összesített impakt faktora: 39.349; absztraktok összesített impakt faktora (közlemények nélkül): 78.866

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném hálámat kifejezni **Wittmann István Professor Úrnak** és **Nagy Judit Professor Asszonynak**, hogy lehetőséget kaptam Tőlük a II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum nagyszerű kutatókból és klinikusokból álló munkacsoportjához tartozni, a tudományos karrieremben és klinikai munkámban nyújtott folytonos, önzetlen támogatásukért az egyetemi éveim alatt és azt követően. Kitűnő oktatómunkájuk, útmutatásaik és biztatásuk nélkül nem lettem volna képes Ph.D. tanulmányaimat befejezni.

Rendkívüli hálával tartozom **Professor John C. Chatham**-nek, aki meghívott kutatócsoportjába (Division of Cardiovascular Disease at University of Alabama at Birmingham) ahol nagyon kellemes környezetben dolgozhattam, köszönettel tartozom munkám során nyújtott lelkes(ítő) támogatásáért, különösképpen produktív és inspiráló tanácsaiért, melyek nagymértékben segítettek kutatói gondolkodásomomat is.

Köszönettel tartozom **Dr. Wagner László**-nak, **Dr. Mazák István**-nak, **Dr. Wagner Zoltán**-nak hallgatói éveim során nyújtott folyamatos segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Molnár Gergő**-nek, aki rengeteget segített pályám kezdetén, továbbá hallgatótársaimnak **Dr. Tamaskó Mónika**-nak, **Dr. Markó Lajos**-nak, **Dr. Cseh Judit**-nak, **Dr. Mohás Márton**-nak közös munkák során nyújtott segítségükért, a laborban együtt töltött örömteli pillanatokért és közösen elért sikerekért.

Ugyancsak hálás köszönettel tartozom **Heitmanné Lendvai Anikó**-nak és **Dr. Sámikné Varga Ica**-nak, akik megtanítottak a laborélet szabályaira, a precizításra, kiváló technikai asszisztenciájukért, és nem utolsósorban 'anyai' szeretetükért és barátságukért.

Örülök, hogy olyan baráti kollegákra leltem, mint **Bodor Enikő** és **Rumszauer Zsuzsanna**, akik minden alkalommal segítettek még teljesíthetetlennek tűnő feladatok megoldásában is, hálásan köszönöm Nekik hivatalos ügyekben nyújtott szervezői és adminisztratív munkájukat.

Kivételes köszönettel tartozom **Charlye A. Brocks**-nak, aki első ízben mutatta meg nekem 'A Déliek híres vendégszeretet'-ét, birminghami tartózkodásom alatt a laboron kívüli lételem élvezetességé, kutatói munkámat gördülékenyvé tette, számomra mindig igazi barát marad. Való igaz, nagyszerű technikai segítsége és barátsága nélkül munkáimat nem tudtam volna így teljesíteni.

Külön köszönetet szeretnék mondani szerzőtársaimnak, akik egyben a barátaim is, **Dr. Sue A. Marsh**-nak konstruktív tanácsaiért, kritikáiért és értékes közreműködését munkáim során, **Dr. Fülöp Norbert**-nek, aki megtanította nekem a szívperfúziót és ötleteivel, alaposágával nagymértékben hozzájárult munkáim eredményességéhez, külön hálás vagyok **Dr. Nőt László Gergely**-nek aki mindig mellettem állt, és mind magánéleti, mind szakmai téren számíthattam segítségére, támogatására, figyelmére.

Szintén köszönettel illetem kedves volt kollégáimat **Prof. Dr. Richard B. Marchase** és **Prof. Dr. John C. Chatham** laborjában **Erica Taylor**, **Xiaoyuan Zhu**, **Luyun Zou**, **Dan Shan**, **Vorarrat Champattanachai**, **Kai He**, és **Chris Calderon**. Mindannyiuknak köszönöm barátságát és a birminghami évek során nyújtott segítségüket.

Ugyancsak köszönettel tartozom **Prof. John C. Chatham**-nek, hogy munkámat érdemesnek tartotta arra és lehetőséget kaptam, hogy kollaboráció keretén belül elismert kutatócsoportok neves vezetőivel és tagjaival dolgozhassak együtt. Ezúton köszönöm **Prof. Dr. Richard B. Marchase** (President of the Federation of American Societies for Experimental Biology), **Prof. Dr. Suzanne Oparil** (President of the American Society of Hypertension), **Prof. Dr. Victor Darley-Usmar** (President of the Society for Free Radical Biology and Medicine), **Prof. Dr. Christine Des Rosiers** (Montreal Heart Institute, Université de Montréal), **Prof. Martin E. Young D.Phil.** (Division of Cardiovascular Disease, UAB), **Dr. James A. Mobley** (Director of Bioanalytical and Mass Spectrometry Facility, UAB), **Prof. Dr. Andrew J. Paterson** (Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, UAB), **Prof. Dr. Roger C. White** (Division of Cardiovascular Disease, UAB) közös munkánk során nyújtott segítségüket, továbbá **Elena Ulasova**, **Arzu Onay-Besikci**, **Bradford G. Hill**, **Kai Wang** és **Landon Wilson** szerzőtársaimnak.

Köszönöm ezenkívül **Mindenkinek**, **Barátoknak**, **Kollégáknak** akik nem kerültek felsorolásra a fentiekben, de segítettek szakmailag és/vagy magánéletemben.

Végül, de nem utolsósorban kimondhatatlanul hálás vagyok **Családomnak**, gondos szeretetük és támogatásuk nélkül egyáltalán nem lettem volna képes megvalósítani céljaimat és álmaimat!