

**A NEM-ENZIMATIKUS GLIKÁCIÓ ÉS AZ ELŐREHALADOTT  
GLIKÁCIÓS VÉGTERMÉKEK SZEREPE A VESEBETEGSÉGEK  
PROGRESSZIÓJÁBAN, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A  
DIABETESES NEPHROPATHIÁRA**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Wagner Zoltán

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

Pécs, 2003

## BEVEZETÉS

Nem-enzimatis glikációnak nevezzük azt a több lépésben zajló, egy idő után irreverzibilissé váló folyamatot, mely redukáló monoszacharidok és aminocsoportot tartalmazó molekulák (fehérjék, DNS és lipidek) közt játszódik le. A glikáció során reaktív szabad gyökök és glikációs intermedierek képződnek, valamint előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-product, AGE) jönnek létre.

Sejttenyészeteken végzett vizsgálatok mellett állatkísérletek és humán tanulmányok egész sora bizonyítja, hogy az AGE-termékek fontos szerepet játszanak a vesebetegségek progressziójában, illetve a krónikus veseelégtelenség és a cukorbetegség szövődményeinek kialakulásában.

## CÉLKITŰZÉS

A glikációs folyamatok modellezése és a glikációs végtermékek képződését és felhalmozódását befolyásoló tényezők tanulmányozása során céljaink a következők voltak:

- ▶ **A glikációs intermedierek metilglioxál (MGO) hatásainak vizsgálata in vitro és ex vivo rendszerekben:**
  - Az MGO és az L-arginin reakciója során képződő szabad gyökök vizsgálata in vitro modellben. A vas szabadgyök-képződésre gyakorolt hatásának felmérése.
  - Az MGO + L-arginin reakciótermék abszorpciós spektrumának regisztrálása, a vas katalizáló hatásának vizsgálata e rendszerben.
  - Az MGO vasredukáló képességének vizsgálata.
  - Izolált vörösvértestek intracelluláris szabad gyök szintjének, alacsony mólsúlyú thiol tartalmának és kalcium koncentrációjának mérése MGO-val történő expozíció után.
  - A glomeruláris haematuriára jellemző vörösvértest morfológia kialakulásának modellezése in vitro MGO segítségével.

▶ **A magas hőmérsékleten zajló glikációs folyamatok és a hőkezelt ételekből származó glikációs végtermékek hatásainak vizsgálata:**

- Az ételek hőkezése során lejátszódó szabadgyökös-glikációs folyamatok modellezése in vitro.
- A hőkezelt, magas proteintartalmú ételeknek az AGE szintekre és a veseműködésre kifejtett hatásának vizsgálata egészséges önkéntesekben.

▶ **Az AGE-termékek sűrumszintje és a különböző klinikai paraméterek közötti összefüggések vizsgálata krónikus vesebetegségekben:**

- Diabeteses nephropathiában szenvedő betegek AGE szintjének vizsgálata.
- IgA nephropathiában (IgA NP) szenvedő betegek AGE szintjének vizsgálata.

▶ **A művesekezelésnek a sűrűség AGE szintre gyakorolt hatásának vizsgálata:**

- A sűrűség AGE szint alakulása különböző művesekezelési eljárások során.
- Az AGE-termékek visszatelődésének vizsgálata a művesekezést követően.

## **MÓDSZEREK**

Szabad gyökök kimutatása a glikációs reakciók során: Az MGO és az L-arginin reakciója során képződő szabad gyököket elektronspin rezonancia (ESR) vizsgálattal elemeztük. A vas katalizáló hatásának vizsgálatához ferri vagy ferro iont adtunk a rendszerhez, illetve a vas ionok hatását desferrioxaminnal és ferrozinnal gátoltuk. A glukóz + L-arginin reakcióban magas hőmérsékleten (65-90°C) képződő szabad gyököket szintén ESR segítségével vizsgáltuk. A szabad gyökök koncentrációját az ESR-jel kettős integráljának segítségével határoztuk meg. Az MGO vasredukáló képességének vizsgálata ferrozin segítségével, spektrofotometriás módszerrel történt. Az MGO + L-arginin reakció termékének abszorpciós spektrumát és a reakció során lejátszódó színreakció időbeli lefutását spektrofotométerrel rögzítettük. Az izolált, mosott vvt szuszpenzióban az ionizált kalcium intracelluláris

koncentrációját fura-2-pentakis-acetoximetilészterrel (Fura-2-AM), az intracelluláris szabadgyök-képződést dichlorofluoresceinnel mértük fluoreszcens spektrofotométer segítségével. Az alacsony mólsúlyú thiol vegyületek szintjét a vvt-kben perklórsavas hemolízist és fehérjekicsapást követően, *O*-phthalaldehid (OPA) segítségével, fluoreszcens módszerrel határoztuk meg. A glomeruláris típusú vvt-k képződésének megítélésére az MGO-val kezelt, izolált vvt-eket fénymikroszkóppal és pásztázó-elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A szérumminták alacsony mólsúlyú (AM) frakcióját 10 kD filtrációs küszöbvel rendelkező szűrők segítségével szeparáltuk. Az N<sup>ε</sup>-karboximetil-lizin (CML) koncentrációját a szérum és a vizelet mintákban kompetitív ELISA módszerrel mértük. Az AGE-fluoreszcenciát az 50-szeresre hígított szérum mintákban három párhuzamos mérés során, 370 és 355 nm-es hullámhosszon történt excitációt követően, 440 és 460 nm-es hullámhossznál határoztuk meg fluoreszcens spektrofotométerben. A fluoreszcens AGE-termékek mólsúly szerinti megoszlásának vizsgálatához gélfiltrációs kromatográfiát alkalmaztunk gyors protein folyadékkromatográfiás (FPLC) készülék segítségével, UV és fluoreszcens detektor egyidejű alkalmazásával. A szérumban az oxidatív stressz becslésére a thiobarbitursav reaktív szubsztanciák (TBARS) szintjét határoztuk meg.

## ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### A metilglioxál és az L-arginin reakciójának vizsgálata

Ismert, hogy a glikáció szabadgyök-képződéssel jár. Az egyik legismertebb és legtöbbet vizsgált glikációs intermedier, az MGO. Az L-arginin glikációja során az MGO által keltett szabad gyököket ESR vizsgálattal elemeztük. Megvizsgáltuk a szabadgyök-képződésben fontos szerepet játszó vas hatását az L-arginin + MGO reakcióra.

- I. Az L-arginin + MGO reakció során ESR vizsgálattal egy keresztkötésben elhelyezkedő kation gyökre jellegzetes spektrum detektálható.

II. A szabadgyök-képződést koncentrációfüggő módon fokozta a ferri ion, és gátolta a ferro ion. A vas ionok szabadgyök-képződésre gyakorolt hatása a ferri ion esetében desferrioxaminnal, a ferro ion esetében ferrozinnal kivédhető volt.

ESR vizsgálataink szerint az MGO a ferri ionnal reakcióba lép, hiszen az MGO által kiváltott szabadgyök-képződést a ferri ion fokozta. Egy lehetséges reakció az MGO és a ferri ion között a ferri ion MGO hatására bekövetkező redukciója. Ennek bizonyítására ferrozin felhasználásával spektrofotometriás módszert dolgoztunk ki.

III. Az MGO hatására a ferri ion ferro ionná redukálódott.

Az ESR vizsgálatok azt mutatták, hogy a ferri és a ferro ion eltérően befolyásolja a szabadgyök-képződést az L-arginin + MGO reakcióban. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a kétféle vasion eltérő termékek képződésének irányába tereli a reakciót. E kérdés megválaszolására összevetettük az L-arginin + MGO reakcióban a ferri illetve a ferro ion jelenlétében képződő termékek abszorpciós spektrumát.

IV. Az L-arginin + MGO reakció során mind a ferro, mind pedig a ferri ion jelenlétében megegyező abszorpciós spektrumú reakciótermék képződött, melynek abszorpciós maximuma 490 nm-nél detektálható. A ferro ion a színreakciót a ferri ionnál erősebben katalizálta.

Az L-arginin + MGO reakció vizsgálata során kapott eredményeinket összegezve valószínűsíthető, hogy a ferri ion az MGO-val redox reakcióba lépve, a szabadgyök-képződés fokozódása mellett katalizálja a spektrofotométerrel detektálható termék képződését. Ugyanakkor a ferro ion közvetlenül, szabad gyökök keltése nélkül képes katalizálni az L-arginin + MGO reakciót. Ezzel magyarázható az, hogy az ESR-rel mért szabadgyök-

képződést a ferri ion fokozta, a ferro ion gátolta. továbbá az, hogy a 490 nm-nél detektálható színreakciót a ferri ion kisebb, a ferro ion nagyobb mértékben katalizálta.

Az L-arginin reakciója MGO-val azért is különösen fontos, mivel az L-arginin, mint a nitrogén monoxid szintáz enzim szubsztrátja, kiemelt helyet foglal el az aminosavak között. Glikációja során az L-arginin a guanidino-csoportjával vesz részt a reakcióban, amit több AGE struktúra (pl. pentozidin, metil-imidazolon) szerkezete is bizonyít. A nitrogén monoxid szintáz (NOS) enzim az L-arginin guanidino-csoportjából hasítja le az NO-t. Számos adat utal arra, hogy az NO felszabadulás diabetesben zavart szenved. A jelenség hátterében a NOS enzim működését kompetitív módon gátló, módosult L-arginin metabolit akkumulációja sem zárható ki. Ezért az aminosavak közül az L-arginin glikációja kiemelt fontosságú lehet.

### **A metilglioxál sejtkárosító hatásának vizsgálata izolált vörösvértestekben**

Az irodalom szerint az MGO károsítja a sejtek intracelluláris ionháztartását, hatására emelkedik az intracelluláris kalcium koncentráció, ennek pontos mechanizmusa azonban ismeretlen. Vörösvértestekben megfigyelték, hogy az oxidatív stressznek fontos szerepe van a kalcium homeosztázisban. In vitro kísérleteink szerint az MGO szabadgyök-képződést vált ki az aminocsoportot tartalmazó molekulák (esetünkben az L-arginin) módosítása során. A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy izolált vvt-kben kimutatható-e szabadgyök-képződés az MGO hatására, illetve, hogy kialakul-e ennek kapcsán kalcium akkumuláció. Az intracelluláris szabadgyök-képződés és kalcium szint mérése mellett megvizsgáltuk a vvt-kben az intracelluláris, alacsony mólsúlyú thiol vegyületek szintjének alakulását, ami szintén az oxidatív stressz markere. Az MGO szabadgyök-képződést és kalcium akkumulációt okozó hatásait antioxidánsokkal (SOD, kataláz, trolox, GSH és desferrioxamin) próbáltuk kivédeni.

- V. Intracelluláris fluoreszcens indikátorok segítségével bizonyítottuk, hogy izolált humán vörösvértestekben az MGO fokozza a szabadgyök-képződést és növeli az intracelluláris kalcium koncentrációt.
- VI. Az MGO oxidatív stresszt és kalcium akkumulációt okozó hatása antioxidánsok segítségével kivédhető volt.
- VII. Az MGO hatására csökkent a vörösvértestek alacsony mólsúlyú thiol tartalma.

Eredményeink szerint az MGO a szabadgyök-képződést okozó hatása révén eredményez kalcium akkumulációt. A thiol depléció a fokozott szabadgyök-képződésnek oka és következménye is lehet. A kalcium intracelluláris koncentrációjának emelkedése a vörösvértestek rigiditásának fokozódásához vezet, ami rontja a mikrocirkulációt, és hozzájárulhat a diabetes mikrovaszkuláris szövődményeinek kialakulásához.

Az oxidatív és a karbonil stressz szerepét a glomerulonephritisek pathogenesisében is felvetették. Bizonyos glomerulonephritisek esetén a vizeletüledékben talált, membránkárosodást szenvedett, úgynevezett glomeruláris típusú vörösvértestek jellegzetes eltérésnek tekinthetők. Felmerült, hogy a vizeletbe jutott vörösvértestek membránkárosodását oxidatív illetve karbonil stressz okozza, melynek kiváltásához vvt-modellünkben MGO-t használtunk.

- VIII. Fénymikroszkópos és pásztázó-elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint az MGO hatására glomeruláris haematuriára jellemző vörösvértest-membrán deformitások jöttek létre.
- IX. Az MGO koncentrációfüggő módon, már 10 perc inkubációs idő alatt szignifikánsan növelte a glomeruláris típusú vörösvértestek arányát in vitro modellünkben.

Vizsgálataink során az MGO molekuláris szintű hatásainak (thiol deplécio, oxidatív stressz, kalcium akkumuláció) egy morfológiai következményét is dokumentáltuk. MGO segítségével sikerült olyan vvt elváltozásokat létrehozni in vitro, melyek az úgynevezett glomeruláris (immun-pathomechanizmusú glomerulonephritisekben megfigyelhető) haematuriára jellemzőek. Korábbi elméletek szerint a vvt-k a GBM szakadásain történő átpréselődésük során, vagy a tubulusokban, az ozmotikus stressz hatására deformálódnak. Izolált vvt-eket különböző ozmolaritású oldatokkal inkubálva azt találtuk, hogy az ozmotikus stressz önmagában nem elégséges a glomeruláris típusú vvt-k kialakulásához (az értekezésben nem részletezett eredmények). Eredményeink alapján a glomeruláris haematuriában megfigyelhető deformált vvt alakok kialakulásának egyik magyarázata a fokozott karbonil és oxidatív stressz lehet.

#### **Az L-arginin glikációja során, magas hőmérsékleten képződő szabad gyökök vizsgálata**

A nem-enzimatis glikáció először az élelmiszerkémiai kutatások tárgyát képezte. Az előrehaladott glikációs végtermékeket tették felelőssé a hőkezelt (sült, főtt) ételek zamataért és barnás színéért. Ismert, hogy a nem-enzimatis glikáció során szabad gyökök képződnek. A magas hőmérsékleten zajló glikációs folyamatok során képződő szabad gyököket ESR-rel tanulmányoztuk.

X. Glukóz és L-arginin együttes főzése során 65-90°C-on szabadgyök-képződésre utaló ESR-spektrumot kaptunk, melynek analízise alapján a keletkezett vegyület, a kölcsönható molekulák figyelembevételével, pirimidinil vagy pirazil típusú szabad gyök lehet.

XI. Az L-arginin + glukóz reakció során detektálható szabadgyök-képződés hőmérsékletfüggő.

Az L-arginint és glukózt tartalmazó oldatban magas hőmérsékleten keletkező szabad gyökök jelentősége abban van, hogy a hőkezelés (sütés, főzés) során az ételek szénhidrát és fehérje (vagy aminosav) tartalma között hasonló reakciók játszódhatnak le. Az így elkészített táplálékkal reaktív szabad gyökök és glikációs végtermékek juthatnak a szervezetbe.

### **A glikációs végtermékekben gazdag, hőkezelt ételek fogyasztásának hatása a szérum és vizelet glikációs végtermék szintekre és a veseműködésre**

Az ételek hőkezelése során nem csupán az előző pontban tárgyalt glikációs reakció játszódik le. Az ételek sütése, főzése számos más AGE-termék képződését is eredményezi. A hőkezelt ételekben is fellelhető glikációs termékek közül a CML példáján elemeztük a táplálék eredetű AGE-termékek felszívódását és veseműködésre kifejtett hatását.

Megvizsgáltuk, hogy a hőkezelt (sütött, főzött) ételek fogyasztása hogyan befolyásolja a vizelet albuminürítést és a kreatinin clearancet egészséges önkéntesekben. A vizsgálat során az önkéntesek szérum CML szintjének és vizelet CML ürítésének változásait is nyomon követtük. A hőkezelt ételek hatását nyers ételek fogyasztásának hatásával vetettük össze, a nyers ételekben ugyanis a glikációs végtermékek szintje elhanyagolható. A renális hatások provokálása céljából mind a hőkezelt, mind a nyers diéta fehérjetartalmát 3 g/ttkg/nap-ra állítottuk.

- XII. A magas proteintartalmú, nyers ételek fogyasztása alacsony CML bevitellel társul, hatására jelenősen csökken a vizelettel ürülő CML mennyisége.
- XIII. A magas proteintartalmú, hőkezelt ételek fogyasztása fokozott CML bevitelt jelent, hatására megnő a szérum CML szint és a vizelet CML ürítés.
- XIV. A magas proteintartalmú, hőkezelt, vagyis CML-dús ételek hatására fokozódott a vizelet albumin ürítés.

A magas fehérjetartalmú diéta fogyasztása tehát a szokásos hőkezelési eljárások (sütés, főzés) alkalmazása esetén fokozott CML bevitellel társul. Ugyanakkor a hőkezelés nélkül elkészített ételek (CML szegény diéta) magas protein tartalmuk ellenére nem okoztak szérumban CML szint emelkedést, sőt a vizelet CML ürítését csökkenését eredményezték.

A fokozott CML bevitelnek jelentős kórélettani hatásai lehetnek. A CML-tartalmú fehérjék ugyanis specifikusan kötődnek a RAGE receptorokhoz, és aktiválják azokat. A receptor aktivációja különböző celluláris jelátviteli mechanizmusokon keresztül a diabetes és a krónikus veseelégtelenség szövődésében kulcsszerepet játszó gyulladásgéneket expressziójához vezet.

A diétából származó AGE-termékek vesére kifejtett hatásait vizsgálva nem találtunk eltérést a kreatinin clearance vonatkozásában, azonban a vizelet albuminürítés a CML-dús proteinterhelés hatására megemelkedett. Általánosan elfogadott gyakorlat, hogy a vesebetegeknek a proteinbevitel mérséklését javasoljuk, mivel a tapasztalatok szerint a proteinbevitel korlátozása kedvezően befolyásolja a vesebetegség progresszióját mind diabeteses nephropathiában, mind nem diabeteses vesebetegségekben. A diétás proteinrestrikció kedvező hatásának magyarázata nem teljesen ismert. Vizsgálatunkban csak az AGE-termékekben gazdag proteinterhelés váltott ki statisztikailag szignifikáns albuminuria növekedést, az AGE szegény proteinterhelés nem, ami arra utal, hogy a proteinterhelés albuminuriát okozó hatásának fontos összetevője lehet az ételekből származó AGE. Mivel az ételek elkészítésekor a fehérjéket általában jelentős hőhatás éri, a magas protein tartalmú, szokásos módon elkészített ételekben fokozott AGE-képződéssel kell számolni. Eredményeink alapján felmerül, hogy a magas proteinbevitel a hozzá társuló AGE terhelés révén fejt ki kedvezőtlen hatását.

Összefoglalva, a szérumban és a vizeletben AGE szinteket táplálkozási szokásaink is befolyásolják. A hőkezelt ételek, magas AGE tartalmuknál fogva a keringő és a filtrált

glikációs végtermékek fontos forrásai. Különösen kedvezőtlen lehet a táplálékkal bevitt AGE-k hatása a cukorbetegségben és a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekre, mivel esetükben az AGE-termékek vesén keresztül történő eliminációja elégtelen. A táplálékkal bevitt AGE-termékek káros hatásának ismeretében felmerülhet bizonyos konyhatechnikai elvek (túlzott hőkezelés kerülése, több nyers zöldség fogyasztása, stb.) népszerűsítése, és a krónikus veseelégtelenségben szenvedők, illetve a romló vesefunkciójú cukorbeteg esetében az AGE-szegény diéta kidolgozásának igénye is.

### **A glikációs végtermékek szérumszintjének összefüggése a vesefunkcióval diabeteses nephropathiában**

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy végstádiumú veseelégtelenség esetén, mind a diabeteses, mind a nem diabeteses betegekben magas a szérum AGE szint. Keresztmetszeti vizsgálatunkkal arra kerestük a választ, hogy normál vagy enyhén beszűkült vesefunkciójú cukorbetegünkben hogyan alakul a glikációs végtermékek szérumszintje.

- XV. A csökkent vesefunkciójú cukorbeteg napi vizelet CML ürítése alacsonyabb, mint a normális vesefunkciójú betegeké.
- XVI. A csökkent vesefunkciójú cukorbetegben a normális vesefunkciójú betegekhez képest magasabb szérum AGE-fluoreszcencia és szérum CML szint mérhető, mely utóbbi elsősorban az alacsony mólsúlyú CML szintjének emelkedéséből fakad.
- XVII. A csökkent vesefunkciójú cukorbetegben a szérum AGE-fluoreszcencia és a szérum CML szint szoros korrelációt mutat a vesefunkció paramétereivel.

Diabetesben a glomeruláris funkció tehát már enyhe vesefunkció romlás esetén is meghatározó tényezővé válik a szérum AGE szintek szempontjából. A vesebetegségekben a

magas szérumszintet az AGE prekursorok és az AGE-termékek vesén keresztül történő eliminációjának csökkenése eredményezi. Ennek megfelelően szignifikánsan alacsonyabb vizelet CML ürítést figyeltünk meg beszűkült vesefunkciójú betegeinkben. Mivel a vizelettel ürülő CML főként az alacsony molekulású tartományba esik (nem publikált adatok), veseelégtelenségben főleg az alacsony mólsúlyú CML szérumszintjének emelkedésére számíthatunk. Vizsgálatunk szerint vesefunkció romlás esetén valóban megnő a szérumban az alacsony mólsúlyú CML frakció aránya. A beszűkült vesefunkciójú betegeinkben mért magasabb szérumszint oka tehát az lehet, hogy a CML vizelettel történő eliminációja csökkent.

#### **A glikációs végtermékek szérumszintjének összefüggése a vesefunkcióval IgA nephropathiában**

Az IgA NP a leggyakoribb krónikus glomerulonephritis forma. 20 évvel a betegség felismerése után a betegek 20-50%-ában krónikus, végstádiumú veseelégtelenség alakul ki. Ezért a betegség progresszióját előidéző vagy azzal összefüggő tényezők kutatása elsőrendű fontosságú. Nem ismert, hogy a vesebetegségek progressziójában fontos szerepet játszó glikációs végtermékek és az oxidatív stressz termékek szérumszintje hogyan alakul ebben a betegségben.

- XVIII. A beszűkült vesefunkciójú IgA NP-s betegek szérumszintjének AGE-fluoreszcenciája és CML szintje magasabb, mint a normális vesefunkciójú betegeké.
- XIX. IgA NP-s betegekben a szérumszintjének AGE-fluoreszcencia és a CML szint szignifikáns negatív korrelációt mutat a kreatinin clearance értékkel.
- XX. Mind a csökkent, mind a normális vesefunkciójú IgA NP-s betegekben magasabb a szérumszintjének TBARS szint, mint az egészséges kontrollokban.

IgA nephropathiában szenvedő betegek vizsgálatával a diabeteses betegekben találtakhoz hasonló eredményekhez jutottunk. Ezen eredmények is arra utalnak, hogy a glikációs végtermékek szérumszintjének kialakításában a vese glomeruláris funkciójának döntő szerepe van.

A magas TBARS értékek a normális és a csökkent vesefunkciójú IgA NP-s betegekben munkacsoportunk korábbi adataival együtt azt jelzik, hogy az IgA NP-s betegekben fokozott az oxidatív stressz.

Mind a diabeteses, mind pedig az IgA nephropathiás betegekben azt találtuk, hogy az előrehaladott glikációs végtermékek szérumszintje a vesefunkció romlásával megemelkedik. A magasabb koncentrációban keringő AGE-termékek (vesekárosító hatásuk miatt) ezen kórképekben hozzájárulhatnak a vesebetegség progressziójához, ami egy circulus vitiosus kialakulásához vezet.

### **A glikációs végtermékek szérumszintjének alakulása hemodialízissel, hemofiltrációval illetve hemodiafiltrációval kezelt betegekben**

A vesefunkció beszűkülésével emelkedik a glikációs végtermékek szérumszintje. A folyamat végét jelentő krónikus veseelégtelenségben a szérum AGE szint eléri a normál érték három-, négyszeresét. Négy művese-kezelési módszert hasonlítottunk össze az egy kezelés során elérhető AGE szint csökkenés és a kezelés előtti szérum AGE szintek szempontjából. A kezelési típusok a következők voltak: hemodialízis (HD) standard dializáló folyadékkal (SDF), HD ultrafiltrált dializáló folyadékkal (UDF), hemodiafiltráció (HDF) és hemofiltráció (HF).

XXI. A HD SDF esetében a szérum AGE szint szignifikánsan magasabb, mint a HD UDF, a HDF vagy a HF kezelés mellett.

XXII. Az SDF használata mellett észlelt magasabb AGE szintek elsősorban a fehérjéhez kötött, nem dializálható AGE frakció szintjének fokozódásából fakadnak. Az egy kezelés során elérhető AGE szint csökkenés szempontjából nem volt különbség a kezelési módszerek között.

A HF és a HDF esetén (mindkét kezelési típusban konvektív transzport érvényesül) a peptidek hatékonyabb eltávolításáról számoltak be, ezért ebben a két csoportban alacsonyabb AGE szintekre számítottunk. A HF és a HDF a konvektív transzport érvényesülésén kívül abban is különbözik az SDF-fel történő HD-től, hogy a HDF-hez ultrafiltrált dializáló folyadékot használnak, a HF esetében pedig nincs szükség dializáló folyadékra. A folyadékminőség szerepének tisztázása érdekében volt szükség a HD SDF csoport mellett egy UDF-fel kezelt HD csoport létrehozására is.

Várakozásunknak megfelelően azt találtuk, hogy a kezelés előtti szérum AGE szint a HDF-fel és HF-fel kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb, mint a HD SDF csoportban. Azonban az AGE eltávolítás hatékonyságában a HDF és a HF csoport nem különbözött szignifikánsan a HD csoportoktól. Emiatt a HDF és a HF csoportban mért alacsonyabb AGE szinteket nem lehetett a hatékonyabb AGE eltávolítással megmagyarázni. Ráadásul a szérum AGE szint az UDF alkalmazásával kezelt hemodializált betegekben szintén alacsonyabb volt, mint a HD SDF csoportban, de nem különbözött a HDF és a HF csoportban mért AGE szintektől. Mindezek alapján tehát elsősorban a dializáló folyadék minősége tehető felelőssé a HD SDF csoportban mért magasabb szérum AGE szintekért.

A HD SDF csoportban mért magasabb AGE szint lehetséges magyarázata a fokozott AGE-képződés lehet. Erre utalt az a megfigyelésünk is, hogy főként a magas molekulású, albuminhoz kötött, tehát művesekezeléssel nem eltávolítható AGE-k szintje volt alacsonyabb HD UDF-ben, HDF-ben és HF-ben. A fokozott AGE-képződés oka HD SDF-ben a fokozott

oxidatív és karbonil stressz lehet, ugyanis a dializáló folyadék kis mértékű bakteriális kontaminációja is kiválthat fokozott szabadgyök-képződést a mononukleáris sejtekben.

Eredményeink alapján a számos ismert faktor mellett (pl.: reziduális vesefunkció, dializáló membrán tulajdonságai, tápláltsági állapot) a folyadékminőségnek is jelentős hatása van a szérumszintekre művesekezelésben részesülő betegeinkben.

### **A glikációs végtermékek szérumszintjének rebound-kinetikája hemodialízis kezelést követően**

Saját vizsgálati eredményeink szerint a szérumszint egyetlen hemodialízis kezelés alatt 20-30%-kal csökkenthető, ami megfelel a szérumszint nem fehérjéhez kötött, keringő, alacsony mólsúlyú frakciójának. Irodalmi adatok alapján ismert azonban, hogy a szérumszint néhány óra alatt visszatér a kezelés előtti értékre, holott a glikációs végtermékek képződése hosszú ideig tartó folyamat. A keringő AGE mennyiség visszatelődését a szérumszint-AGE-fluoreszcencia és a szérumszint-CML szint rebound-kinetikájának példáján kívántuk tanulmányozni.

Tanulmányunkban 7 krónikus dialízis programban kezelt, hemodializált betegtől vettünk vért a kezelés előtt, a kezelés befejezésekor, továbbá 30, 60, 120, 240 és 360 perccel a kezelés befejezését követően.

XXIII. Az alacsony mólsúlyú, dializálható CML frakció szérumszintje a művesekezelést követően 6 órán belül szignifikáns visszatelődést mutat.

XXIV. A fluoreszcens AGE szint esetében nem mutatható ki visszatelődés a kezelést követő 6 órán belül.

Számos tanulmány utal arra, hogy az AGE-termékeket művese-kezeléssel nem lehet tökéletesen eltávolítani a keringésből, ráadásul az alacsony mólsúlyú AGE komponensek a

dialízis kezelést követően az extravaszkuláris térből hamar visszatelődnek. Vizsgálatunk szerint az alacsony mólsúlyú CML hasonló kinetikával telődik vissza, mint az egyéb alacsony mólsúlyú metabolitok. Az alacsony mólsúlyú fluoreszcens AGE komponensek esetében azonban elmaradt a gyors visszatelődés, ami arra utal, hogy az extravaszkuláris térben nincsenek diffuzibilis, alacsony molekulásúlyú, fluoreszcens AGE-termékek. A fluoreszcens AGE szintje később tér vissza a kezelés előtti szintre, aminek a de novo szintézis, vagy a magas molekulásúlyú fluoreszcens AGE-k lebomlása lehet a forrása. Ez a megfigyelés arra is felhívja a figyelmet, hogy az AGE-termékeket, heterogenitásuk miatt nem mindig lehet csupán egyik vagy másik képviselőjük mérésével jellemezni.

## **ZÁRSZÓ**

Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy betegeink számára komoly előnyöket jelenthetne a glikációs végtermékek endogén képződése és exogén forrásból történő felvétele ellen irányuló terápiás eljárások kifejlesztése, hiszen általuk megakadályozhatnánk, vagy lassíthatnánk a krónikus vesebetegségek, különösen a diabeteses nephropathia progresszióját és késleltethetnénk a krónikus veseelégtelenség szövődményeinek kialakulását.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt Szüleimnek mondok köszönetet szeretetükért és az útravalóért, ami segített eligazodni az élet minden területén. Hálás vagyok Nagyszüleimnek, Testvéreimnek, Feleségemnek és Kisfiamnak türelmükért.

Hálával tartozom programvezetőmnek Prof. Dr. Nagy Juditnak és témavezetőmnek Dr. Wittmann Istvánnak, illetve Prof. Dr. August Heidlandnak és Dr. Reinhard Schinzelnek hogy irányt mutattak a tudományos munkában.

Köszönöm Dr. Wagner Lászlónak, unokatestvéremnek barátságát és önzetlen segítőkészségét minden téren.

Az ESR vizsgálatok kivitelezésében és értékelésében, illetve a statisztikai analízis terén nyújtott segítségéért Prof. Dr. Belágyi Józsefnek és Dr. Pótó Lászlónak tartozom hálával. Köszönet illeti Dr. Degrell Pétert a fénymikroszkópos és a pásztázó elektronmikroszkópos felvételekért, Dr. Kovács Tibort, Dr. Mazák Istvánt, Dr. Vas Tibort és Dr. Molnár Gergőt, továbbá Dr. Sámikné Varga Ilonát, Heitmanné Lendvai Anikót, Udvarácz Ildikót, Wéber Tündét, Szabó Miklósné Emíliát, Bodor Enikót és Golubicsné Pelenczei Gabriellát.

Köszönöm Prof. Dr. Jörg Vienkennek, hogy a Nephrocore program keretében lehetőséget biztosított számomra würzburgi tanulmányutamhoz. Értekezésem elkészítéséhez Prof. Dr. Hans Hennemann, Dr. Andrea Gerdemann, Dr. Veronika Faist, Dr. Rosemarie Kientsch-Engel, Dr. Andreas Solf, Dr. Udo Bahner, Susi Spahr és André Klassen munkája és segítsége is elengedhetetlen volt.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

### Eredeti közlemények

1. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Pótó László, Wagner László, Belágyi József, Nagy Judit. Glukóz szabad gyök képződése hidroxil szabad gyök jelenlétében. *Diabetologia Hungarica* 6: 209-215, 1998
2. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Pótó László, Wagner László, Belágyi József, Nagy Judit. Az arginin glikációjának szabadgyökös mechanizmusa. *Hypertonia és Nephrologia* 3: 194-198, 1999
3. Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit. A nem-enzimatis glikáció szerepe az öregedés, az atherosclerosis és a diabeteses nephropathia pathophysiológiájában és klinikai képének kialakulásában. *Diabetologia Hungarica* 7: 9-21, 1999
4. Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Pótó László, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit. Karbonil stressz-metabolitok kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. *Orvosi Hetilap* 33: 1841-1845, 1999
5. Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Pótó László, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit. Glikációs végtermékek kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. *Orvosi Hetilap* 36: 1997-2001, 1999
6. Wittmann István, Wagner László, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Nagy Judit. Kismolekulasúlyú karbonil stressz-termékek kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. *Magyar Belorvosi Archivum* 1: 49-54, 2000
7. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Mazák István, Schinzel Reinhard, Heidland August, Kientsch-Engel Rosemarie, Nagy Judit. N<sup>c</sup>-(carboxymethyl)lysine levels in type 2 diabetic patients: Role of renal function. *Am J Kidney Dis* 38: 785-791, 2001 (IF: 3,646)
8. Wittmann István, Mazák István, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Wagner László, Vas Tibor, Kovács Tibor, Belágyi József, Nagy Judit. Role of iron in the interaction of red blood cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling. *Chem Biol Interact* 138: 171-187, 2001 (IF: 1,707)
9. Gerdemann Andrea, **Wagner Zoltán**, Solf Andreas, Bahner Udo, Heidland August, Vienken Jörg, Schinzel Reinhard. Plasma levels of advanced glycation end products during haemodialysis, haemodiafiltration and haemofiltration: potential importance of dialysate quality. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1045-1049, 2002 (IF: 2,056)

### Kongresszusi összefoglalók

1. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Belágyi József, Pótó László, Nagy Judit. A nem-enzimatis glikáció szabadgyökös jellege. *Diabetologia Hungarica* 6(Suppl.1): 74, 1998
2. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Pótó László, Wagner László, Belágyi József, Nagy Judit. Glukóz szabad gyök képződése hidroxil gyök jelenlétében - Adatok a diabeteses nephropathia pathomechanizmusához. *Hypertonia és Nephrologia* 3(Suppl.2): 69, 1998

3. Wittmann István, Pótó László, Tóth Gábor, **Wagner Zoltán**, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit. A glikációs végtermékek vizelettel történő, vesefunkciófüggő eliminációja diabetesben. *Hypertonia és Nephrologia* 3(Suppl.2): 87, 1998
4. Wittmann István, Belágyi József, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Nagy Judit. Iron catalyzed glycation of Arginine. *Nephrol Dial Transplant* 13: A109, 1998 (IF: 2,056)
5. Wittmann István, Belágyi József, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Nagy Judit. Glycation of arginine is catalyzed by iron and is resulted in free radical production. *Diabetologia* 41(Suppl.1): A323, 1998 (IF: 5,721)
6. Vas Tibor, Wittmann István, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Nagy Judit. Connection between oxidative stress and glycation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 14: A148, 1999 (IF: 2,056)
7. Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Pótó László, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit. Carbonyl stress products in the urine of diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 14: A106, 1999 (IF: 2,056)
8. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Pótó László, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit. Detection of methylglyoxal adducts in the urine of diabetic patients. *Diabetologia* 42(Suppl.1): A328, 1999 (IF: 5,721)
9. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Mazák István, Vas Tibor, Wagner László, Nagy Judit. Comparison of pyrimidine-like molecules as carbonyl stress products in diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108: A13, 2000 (IF: 1,406)
10. Wittmann István, Wagner László, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Vas Tibor, Nagy Judit. Low molecular weight carbonyl stress-products in the urine of diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108: A13, 2000 (IF: 1,406)
11. Mazák István, Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Wagner László, Vas Tibor, Nagy Judit. Methylglyoxal evokes oxidative stress and calcium accumulation in red blood cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108: A6, 2000 (IF: 1,406)
12. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Mazák István, Vas Tibor, Wagner László, Nagy Judit. Comparison of pyrimidine-like molecules as carbonyl stress products in patients with diabetes mellitus and azotemia. *Nephrol Dial Transplant* 15: A104, 2000 (IF: 2,056)
13. Wittmann István, Wagner László, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Vas Tibor, Nagy Judit. Analysis of low molecular weight carbonyl stress-products in the urine of patients with diabetes mellitus using the lowry method. *Nephrol Dial Transplant* 15: A104, 2000 (IF: 2,056)
14. Mazák István, Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Wagner László, Vas Tibor, Nagy Judit. Methylglyoxal produced in non-enzymatic glycation evokes oxidative stress and calcium accumulation in human red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 15: A103, 2000 (IF: 2,056)
15. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Mazák István, Schinzel Reinhard, Heidland August, Kientsch-Engel Rosemarie, Nagy Judit. A szérum N<sup>ε</sup>-karboximetil-lizin (CML) szint és a

vizelet CML ürítés összefüggése a vesefunkcióval 2-es típusú diabetes mellitusban. Magyar Belorvosi Archivum (Suppl.2): 76, 2001

16. Vas Tibor, **Wagner Zoltán**, Kovács Tibor, Wittmann István, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. A nem enzimatis glikáció, az oxidatív stressz és az IgA-nephropathia progressziója közti kapcsolat. Magyar Belorvosi Archivum (Suppl.2): 77, 2001
17. Mazák István, Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Pótó László, Faist Veronika, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. Hőkezelt ételek fogyasztásának hatása a glikációs végtermékek szérumszintjére és vizeletürítésére, valamint az albuminuriára. Magyar Belorvosi Archivum (Suppl.2): 78, 2001
18. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Mazák István, Schinzel Reinhard, Heidland August, Kientsch-Engel R, Nagy Judit. N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine levels in type 2 diabetic patients: Role of renal function. Nephrol Dial Transplant 16: A74, 2001 (IF: 2,056)
19. Mazák István, Wittmann István, Pótó László, **Wagner Zoltán**, Kovács Tibor, Wagner László, Vas Tibor, Belágyi József, Nagy Judit. Role of iron and methylglyoxal in diabetic nephropathy. In vitro model using red blood cells. Nephrol Dial Transplant 16: A74, 2001 (IF: 2,056)
20. Wittmann István, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Pótó László, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. Foods rich in advanced glycation end products (AGEs) induce microalbuminuria in healthy persons. Nephrol Dial Transplant 16: A106, 2001 (IF: 2,056)
21. Vas Tibor, **Wagner Zoltán**, Kovács Tibor, Wittmann István, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. The role of non-enzymatic glycation and oxidative stress on the progression of IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant 16: A108, 2001 (IF: 2,056)
22. **Wagner Zoltán**, Wittmann István, Mazák István, Pótó László, Faist Veronika, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. Effects of dietary carboxymethyllysine (CML) intake on CML levels and albumin excretion rates in healthy subjects. Diabetologia 44(Suppl.1): A318, 2001 (IF: 5,721)
23. Schinzel Reinhard, **Wagner Zoltán**, Bahner Udo, Hennemann Hans, Klassen André, Boege Friedrich, Vienken Jörg, Heidland August. Different rebound kinetics of the AGE-CML and AGE-associated fluorescence after hemodialysis. Nephrol Dial Transplant 17(Suppl.7): 158, 2002 (IF: 2,056)
24. **Wagner Zoltán**, Degrell Péter, Vas Tibor, Wagner László, Mazák István, Molnár Gergő, Laczy Boglárka, Nagy Judit, Wittmann István. Carbonyl stress in vitro induces dysmorphic red blood cell formation seen in glomerular haematuria. Nephrol Dial Transplant 18(Suppl.4): 640-641, 2003 (IF: 2,056)