

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA),
mint kapocs az inzulinrezisztencia és az
atherosclerosis között**

Dr. Zsuga Judit

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NEUROLÓGIAI KLINIKA
DEBRECEN, 2007.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA),
mint kapocs az inzulinrezisztencia és az
atherosclerosis között**

Dr. Zsuga Judit

TÉMAVEZETŐ: Dr. Bereczki Dániel



DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NEUROLÓGIAI KLINIKA
DEBRECEN, 2007.

...

I am a part of all that I have met;

Yet all experience is an arch wherethro'

Gleams that untravell'd world, whose margin fades

For ever and for ever I move.

...

Lord Tennyson: Ulysses

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	1
2. Bevezetés	2
<i>Atherosclerosis és inzulinrezisztencia</i>	9
3. Célkitűzések	16
<i>Az ADMA szerepének meghatározása az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia kialakulásában</i>	16
<i>A megközelítőleg fiziológias ADMA szint szerepének vizsgálata az atherosclerosis kísérelő gyulladással állapotban</i>	17
4. Anyagok és módszerek	18
<i>Vizsgálatok fiatalkori carotis stenosisban és occlusióban</i>	18
<i>Az ADMA, SDMA és arginin koncentrációk meghatározása</i>	19
<i>Ultrahang vizsgálat</i>	22
<i>Az inzulinrezisztencia meghatározása</i>	23
<i>Statisztikai elemzés</i>	24
5. Eredmények	27
<i>A szérum ADMA mérésére szolgáló módszer jellemzése</i>	27
<i>A dimetilarginin-szint változása inzulinrezisztenciában és atherosclerosisban</i> ..	32
<i>A közel normális szérum ADMA-szint hatásának vizsgálata az IMT által jellemzett cardiovascularis morbiditásra</i>	37
6. Megbeszélés	42
7. Összefoglalás	49
8. Summary	50
9. Irodalom	51
10. Saját közlemények	61
11. Tárgyszavak	66
12. Köszönetnyilvánítás	67
13. Függelék	68

1. Rövidítések

a.	arteria
ADMA	aszimmetrikus dimetilarginin
Apo-A1	apolipoprotein A1
Apo-B	apolipoprotein B
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
CRP	C reaktív protein
DDAH	dimetilarginin dimetilaminohidroláz
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintetáz
fvs	fehérvérsejt
HARG	homoarginin
HDL-C	magas denzitású lipoprotein
HISS	hepaticus inzulin szenitizáló szubsztancia
HOMA	Homeostasis Model Assessment of β cell function and insulin resistance
hnRNP	heterogén nukleáris ribonukleáris protein
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintetáz
IC ₅₀	félhatásos inhibitoros koncentráció
IMT	intima-media vastagság (intima-media thickness)
KI	konfidencia intervallum
β	regressziós koefficiens
λ_{em}	emissziós hullámhossz
λ_{ex}	a detektor gerjesztési hullámhossza
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
Lp(a)	lipoprotein (a)
MPA	merkaptopropionsav
NOS	nitrogén-monoxid szintetáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintetáz
NO	nitrogén-monoxid
OPA	ortoftalaldehid
PRMT	protein-arginin-metiltransferáz
RSD	relatív standard deviáció
SAH	S-adenozil-homocisztein
SAM	S-adenozil-metionin
SDMA	szimmetrikus dimetilarginin
γ^+ transporter	kationos aminosav transporter

2. Bevezetés

Az atherosclerosisnak és az inzulinrezisztenciának, valamint ezek szövődményeinek egyre növekvő jelentősége van idősödő társadalmunkban. A két jelenséget részleteiben vizsgálva látható, hogy rizikófaktorai egymással jelentős mértékben átfednek, a két betegség evolúciójában szerepet játszó patomechanizmusok pedig több ponton találkoznak. Az egyik ilyen jelentős csomópontot az endothelium által termelt nitrogén-monoxid (NO) képezi. Az NO a rezisztenciaereken kifejtett vasodilatatio mellett számos egyéb kedvező hatással rendelkezik, kvázi endogén antiatheroscleroticus molekulaként viselkedik. Antioxidáns hatása révén gátolja az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) oxidációját, csökkenti a thrombocyták aggregációját és adhézióját, a monocyták és leukocyták adherenciáját és infiltrációját, csökkenti egyes endothelialis adhéziós molekulák és chemokinek expresszióját, antiproliferatív hatása révén pedig szupprimálja a myointimális hyperplasiát (Böger és mtsai 1998, Stühlinger és mtsai 2003). Az endogén NO mindezek mellett összefüggésben áll az inzulinérzékenységgel is (Steinberg és mtsai 1997, Wohlin és mtsai 2003). Az NO tehát potenciális kapocs az atherosclerosis és az inzulinérzékenység között, így érthető, hogy az NO biológiai hozzáférhetőségét csökkentő anyagok e metabolikus elváltozások kialakulásában jelentős szerepet játszhatnak.

Egy potenciális új cardiovascularis rizikófaktor: az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA)

A cardiovascularis és cerebrovascularis betegségek klasszikus rizikófaktorai, a hypercholesterinaemia, a hypertonia, a dohányzás és a cukorbetegség az ischaemiás elváltozások kockázatának csak 20-40%-át magyarázzák, így napjainkban fontos kutatási terület további független vascularis rizikófaktorok keresése (Maas és mtsai 2003).

Másfél évtizede krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben egy endogén anyag, az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) szintjének

megemelkedését írták le (Vallace és mtsai 1992). A későbbiekben kimutatták, hogy az ADMA plazmakoncentrációja bizonyos betegségekben olyan magasra (3-15 $\mu\text{mol/L}$) emelkedik, amely elegendő a nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) hatékony gátlásához (Vallace és mtsai 1992).

Ezt követően prospektív vizsgálatok adatainak többszörös regressziós elemzésével kimutatták, hogy ebben a beteg-populációban a plazma ADMA-szint 2 $\mu\text{mol/L}$ -es növekedése 37%-kal növeli a fatális és a nem fatális cardiovascularis események kialakulásának kockázatát. Kimutatták továbbá, hogy mind a cardiovascularis, mind az összmortalitás viszonylag magasabb plazma ADMA koncentrációval társul ebben a betegcsoportban (Zoccali és mtsai 2005).

Egy másik, 90 krónikus haemodialysis kezelésben részesülő beteg bevonásával végzett prospektív klinikai vizsgálat eredményei szerint az ADMA-szint és a vascularis intima-media vastagság (IMT) között szoros korreláció áll fenn. Egy éves utánkövetés során az ADMA az intimalis laesiók kialakulása szempontjából független prediktornak bizonyult. Ehhez hasonlóan, egy 225 haemodialysisben részesülő beteg bevonásával végzett prospektív vizsgálatban az ADMA és a betegek életkora mutatkozott a legjelentősebb prediktornak a cardiovascularis események és az összmortalitás szempontjából (Böger és Zoccali 2003).

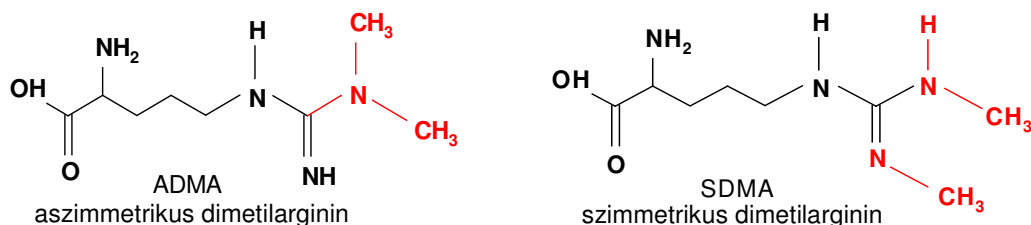
Továbbá, egy eset-kontroll vizsgálatban az acut coronaria események 3,9-szeres kockázatnövekedését figyelték meg a legmagasabb ADMA kvartilisba tartozó, nem dohányzó, középkorú férfiaknál (Valkonen és mtsai 2001).

Egy egészséges (coronaria és más perifériás arteriás érbetegségtől mentes) önkéntesek bevonásával végzett vizsgálat alátámasztotta ezeket az eredményeket, melyben szignifikáns korrelációt mutattak ki az ADMA szint és az IMT között (Miyazaki és mtsai 1999).

Összegezve tehát elmondhatjuk, hogy az ADMA valószínűsíthetően diagnosztikus marker a cardiovascularis rizikó szempontjából, azonban további vizsgálatokra van szükség.

A metilargininek keletkezése

A metilált arginin-származékok a normális fehérje metabolizmus során keletkeznek. Eddigi ismereteink szerint az ADMA, a szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) és az L-N-monometilarginin (L-NMMA) a posttranslatív módosuláson átesett fehérjék proteolízise során keletkeznek (1. ábra). Az aszimmetrikusan metilált származékok (ADMA, L-NMMA) a NOS kompetitív gátlói, míg a szimmetrikusan metilált SDMA ilyen direkt gátló hatással nem bír. Mivel azonban az ADMA plazmakoncentrációja mintegy tízszerese az L-NMMA-énak, az ADMA-nak jelentősebb befolyása van az endothelialis NO termelésére. Emellett az ADMA az endothelialis nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) működésének szétkapcsolásával reaktív oxigén-gyökök keletkezését is előidézheti (Cooke és Mitsui 2000). Megfigyelések szerint az ADMA koncentrációfüggően növeli a szuperoxidok termelését, így olyan redox-potenciál által szabályozott transkripciós faktorokat aktivál, melynek eredményeként endothelialis adhéziós molekulák expresszálnak és fokozódik a monocyták adhéziója (Böger 2003).



1. ábra. Az ADMA és a SDMA szerkezeti képlete. A sejtekben a peptidkötésben levő arginin oldalláncának pirossal jelzett N atomjai metilálódnak (aszimmetrikusan vagy szimmetrikusan).

A fehérjemetiláció olyan posttranslatív folyamat, melynek során a protein metiltransferáz enzimsalád valamely tagja irreverzibilisen metilcsoportot helyez bizonyos aminosavak nitrogén vagy kén atomjára. Az arginin oldallánc nitrogén atomján az aszimmetrikus mono- és dimetilálást a protein-arginin-metiltransferáz I. (PRMT-I) végzi. A PRMT-II aszimmetrikus mono- és szimmetrikus dimetilálást végez. A PRMT-I szubsztrátjai elsősorban RNS kötő fehérjék, mint pl. a heterogén nukleáris ribonukleáris protein (hnRNP), a fibrillamin és a nucleolin. A sejt ADMA

tartalmának mintegy 65%-át a hnRNP-k tartalmazzák. Ezen RNS kötő fehérjék metilációja minden sejtben végbemegy, a metilcsoport donora az S-adenozil-metionin (SAM), így a metiláció melléktermékeként S-adenozil-homocisztein (SAH), majd homocisztein keletkezik (az ADMA és a homocisztein kapcsolatára a későbbiekben még visszatérünk). A PRMT-II enzim elsősorban a bázikus myelin proteinek arginin oldalláncait metilálja, szimmetrikus dimetilarginit eredményezve. Az SDMA az ADMA sztereoizomere, ami nem rendelkezik direkt NOS gátló hatással. A szokásos sejt turnover során kerül sor ezen metilált fehérjék proteolysisére, melyet követően az ADMA, az L-NMMA, valamint a SDMA a cytoplasmába, majd a szisztémás keringésbe kerül (Tran és mtsai 2003).

A metilargininek keletkezhetnek magában a NOS-t tartalmazó sejtben (pl. endothelium) a sejt fehérjéinek turnover során, másfelől a szisztémás keringésből is felvételre kerülhetnek. Az extracelluláris térből az endothel sejtbe a metilargininek egy koncentratív kationos aminosav carrieren, az úgynevezett y^+ transporteren keresztül lépnek be, amely az NO prekursorát, az arginint is szállítja. Így, noha a NOS-t közvetlenül csak az ADMA gátolja, közvetve mind az ADMA, mind a SDMA akadályozza az endotheliumban zajló NO szintézist az arginin sejtbe jutásának kompetitív gátlásával (Chan és mtsai 2002).

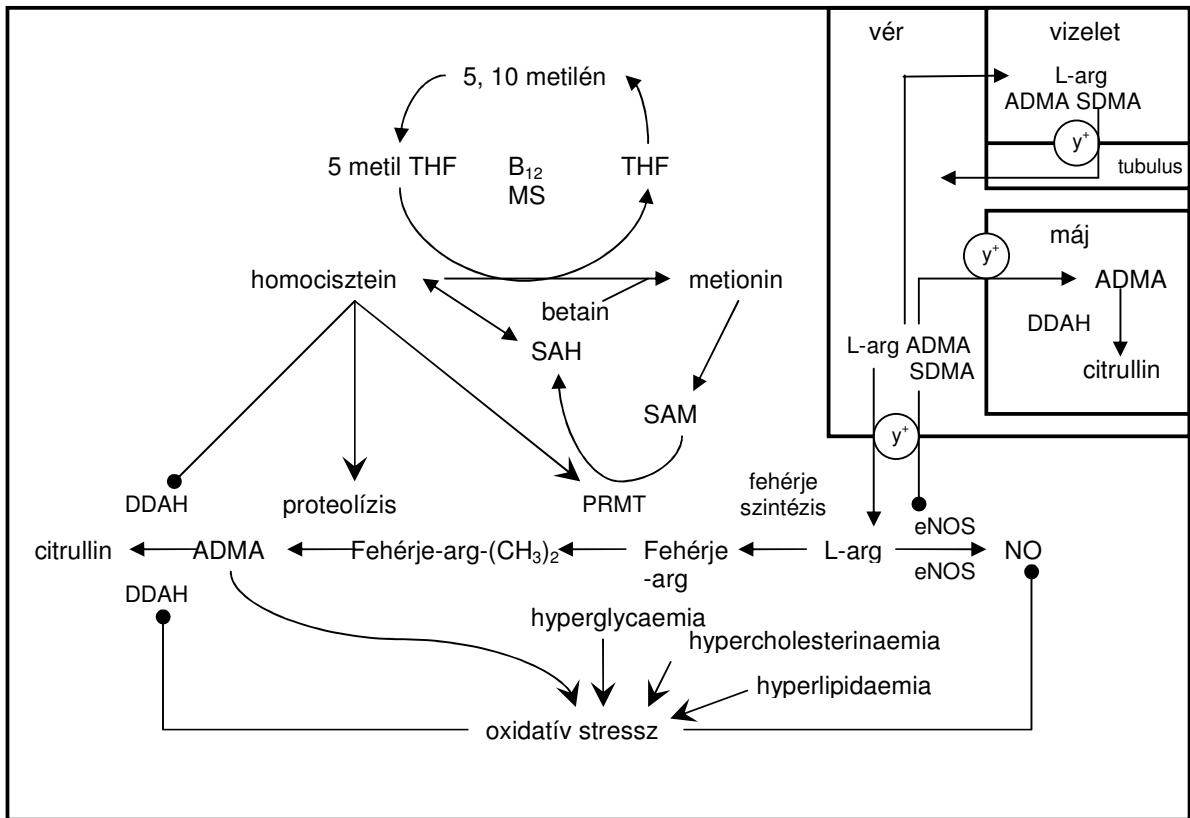
Az ADMA eliminációja

Az ADMA két úton eliminálódik a szervezetből. Egyfelől a plazmába került ADMA a vesetubulusokban excretálódik (ugyanott y^+ transporteren keresztül az L-argininnel kompetícióban részben visszaszívódik), másfelől intracellulárisan a dimetilarginin dimetilaminohidroláz (DDAH) dimetilaminra és citrullinra bontja. A DDAH aktivitását komplex szabályozó mechanizmusok kontrollálják. A DDAH katalitikus kötőhelye szulfhidril-csoportot tartalmaz, ezáltal az enzim nagyfokú érzékenységet mutat az oxidatív stresszel szemben, ami nagy valószínűséggel felelős az ADMA-szint hyperglycaemiában, hypercholesterinaemiában és hyperhomocysteinaemiában való megemelkedéséért. A tumor necrosis factor α (TNF α) által okozott oxidatív stressz szintén csökkenti a DDAH aktivitást (Tran és mtsai 2003). Az ADMA jelentős mértékben metabolizálódik: a parenterálisan beadott ADMA-nak csak körülbelül 5%-a ürül ki a vizelettel (McDermott és mtsai

1976). A szisztémás keringésben megjelenő ADMA metabolizmusában kiemelt szerepet játszik a máj; mind az y^+ transporter, mind a DDAH nagymértékben expresszálódik hepatocytákban (Siroen és mtsai 2005, Nijveldt és mtsai 2003a). *In vitro* vizsgálatok során a DDAH gátlása izolált vascularis preparátumokban argininnel kivédhető vazokonstriktiót eredményezett, felvetve, hogy az ADMA termelődése folyamatos. Ennek tükrében a DDAH elsődleges szerepe az ADMA akkumulációjának meggátlása, így a NOS endogén gátlásának kivédése (Macallister és mtsai 1996). Emlősökben a DDAH két izoformája ismert, a DDAH-1 a neuronális NOS-t expresszáló szövetekben, így az agyban és vese parenchymában jelentős, míg a DDAH-2 a vascularis szövetekben, így többek között az endotheliumban expresszálódik (Lentz és mtsai 2003). Az ADMA szintézisét, transzportját, eliminációját és hatásait a 2. ábra foglalja össze.

Az ADMA és a homocisztein kapcsolata

A hyperhomocysteinaemia kapcsolata az atherosclerosissal már mintegy 40 éve felmerült. A plazma homocisztein-szintjének a referenciatartomány fölé emelkedése a myocardialis infarctus és a mortalitás relatív kockázatát háromszorosra növeli (Stampfer és mtsai 1992). Számos tanulmány igazolja továbbá, hogy hyperhomocysteinaemiában a fokozott áramlás kiváltotta endothelium-dependens vazodilatáció károsodik, azaz vélhetőleg az endothelialis NO termelés csökken (Stühlinger és mtsai 2003, Lentz és mtsai 1996, Symons és mtsai 2002). Ahogy arra már utaltunk, a metilargininek szintézise során S-adenozil-homocisztein, abból pedig homocisztein keletkezik. Ez a kapcsolat az ADMA szintézise és a homocisztein képződése között mindenképp figyelemre méltó. A PRMT-I aktivitását a sejt SAH és SAM szintje szabályozza. A SAM-szint emelkedése serkenti a PRMT-I enzim működését, ezáltal egyidejűleg növeli az ADMA és a homocisztein koncentrációját. Ezen túlmenően egyes megfigyelések szerint a homocisztein gátolja a DDAH aktivitását az endothel sejtben, mivel módosítja az enzim katalitikus aktivitásához szükséges cisztein oldalláncot. A homocisztein serkenti továbbá a proteolysist, valamint fokozza a PRMT-I expresszióját és aktivitását (Lentz és mtsai 2003), vagyis a homocisztein összetett mechanizmussal növelni képes az ADMA szintjét.



2. ábra. Az ADMA metabolizmusa, transzportja és hatásai (arg – arginin; arg-(CH₃)₂ – dimetilált arginin; a többi rövidítést ld. a szövegben illetve a Rövidítések jegyzékében).

A metilargininek farmakodinámiás hatásai

Az endogén NO-t a NOS szintetizálja. Az enzimnek három izoformája ismeretes: az endothelialis (eNOS), a neuronális (nNOS) és az indukálható (iNOS). Az eNOS ADMA általi gátlásának IC₅₀ értéke 3,9 μmol/L endothelialis sejt kultúrákban (Cardounel és mtsai 2002, Mügge és mtsai 2003). Cardounel és munkatársai azt is kimutatták, hogy az aszimmetrikusan dimetilált argininek (így az ADMA és az L-NNMA) neuronális koncentrációja az nNOS több mint 50%-os gátlását eredményezi, tehát az endogén metilargininek a nNOS működését is modulálják fiziológiai körülmények között (Cardounel és mtsai 2002).

Vizsgálták az ADMA hatását a harmadik NOS izoformára, az iNOS-ra, amely cytotoxicus és pro-atherogenicus hatással bír azért, hogy hozzájárul az igen reaktív peroxinitritek keletkezéséhez. Kimutatták, hogy már 1 μmol/L ADMA képes az iNOS majdnem teljes gátlását létrehozni (Ueda és mtsai 2003), tehát már a

referenciatartomány (0,35 és 1,0 $\mu\text{mol/L}$) felső részébe eső illetve azt minimálisan meghaladó (1 és 2 $\mu\text{mol/L}$ közötti) ADMA-szintek elegendőek ahhoz, hogy a NOS atherogén izoformáját csaknem teljesen gátolják. A három NOS izoforma eltérő, sokszor ellentétes hatásokat közvetít, ezzel magyarázható, hogy az eNOS gátlása atherosclerosist, az nNOS-é inzulinrezisztenciát indukálhat, míg az iNOS gátlása antiatherogén hatású. Vagyis, az ADMA, mint a NOS fő endogén gátlója, mind protektív, mind káros hatásokat kifejthet.

Az ADMA direkt NOS inhibitor hatásán túl kimutatták, hogy gátolja az NO termelődését azáltal is, hogy csökkenti az arginin hozzáférését a kationos aminosav transporterhez (y^+ transporter), mely az arginin sejtbe juttatásáért felelős. További megfigyelések felvetik, hogy az ADMA koncentrációfüggően fokozza a szuperoxid termelődést és ezáltal redox szabályozott transcriptiók faktorokat aktivál, mint pl. a nuclearis factor κB (NF κB). Ez elősegíti bizonyos endothelialis és monocita adhesiók faktorok upregulációját (Böger 2003).

Miközben mind több tapasztalat mutatja, hogy az ADMA a legjelentősebb endogén NOS gátló (Kielstein és mtsai 2005), egyre nagyobb figyelem övezi az ADMA szimmetrikus sztereoizomerének, a SDMA-nak a hatásait (Closs és mtsai 1997). Noha a SDMA közvetlenül nem gátolja a NOS-t, csökkenti az NO szintézisét azáltal, hogy verseng az argininnel a sejtbe való bejutásért az y^+ transporter szintjén (az ADMA-val is, de ez inkább protektív hatás). Bár néhány elemzés nem talált korrelációt a SDMA-szint és az összmortalitás, valamint a SDMA koncentráció és egyes cardiovascularis események között (Zoccali és mtsai 2001, Valkonen és mtsai 2001), a kimondottan a SDMA-ra fókuszáló vizsgálatok megállapították, hogy az emelkedett SDMA-szint növeli a cardiovascularis kockázatot (Fleck és mtsai 2003, Fleck és mtsai 2001). Továbbá, a multicentrikus CARDIAC vizsgálat szerint közel normális (1,75 $\mu\text{mol/L}$ alatti) ADMA szinttel rendelkező betegeknél a coronaria betegségek kockázatát az SDMA-szint szignifikánsan befolyásolta (Lenzen és mtsai 2006).

Emelkedett ADMA szinttel járó kórképek

Eddig számos kórképben igazoltak emelkedett ADMA-szintet, mint például a stroke (Yoo és mtsai 2001), a II. típusú diabetes (Lin és mtsai 2002, Abbasi és

mtsai 2001), a hypercholesterinaemia (Böger és mtsai 2001), a hyperhomocysteinaemia (Böger és mtsai 2001) és a krónikus veseelégtelenség (Vallace és mtsai 1992, Kielstein és mtsai 2002). Az ADMA haemodialysissel történő eltávolítását követően, a szisztémás ADMA szint csökkenésével párhuzamosan, a fokozott áramlás kiváltotta vazodilatáció tranzienis javulását figyelték meg (Chan és mtsai 2002). További megfigyelések szerint az ADMA szintje pozitív korrelációt mutat a korrall (Miyazaki és mtsai 1999), a glükóz intoleranciával (Kielstein és mtsai 2002) és az inzulinrezisztenciával (Stühlinger és mtsai 2003). Az inzulin szenzitizáló hatásáról ismert roziglitazon adása párhuzamosan csökkentette az ADMA plazmakoncentrációját és az inzulinrezisztencia mértékét hypertoniás betegekben (Stühlinger és mtsai 2002). Mindezek mellett az ADMA szoros és független kapcsolatban áll az IMT-vel, az atherosclerosis egyik prognosztikus markerével (Miyazaki és mtsai 1999), továbbá kapcsolatban áll az endothelium funkcionális állapotával (emelkedett ADMA szint mellett az endotheliális NO-függő vazodilatáció csökken; Böger 2003). Vagyis, a NOS aktivitásának ADMA általi gátlása olyan független patogenetikai tényező, amely az atherosclerosis többi rizikófaktorával szinergiában képes az atherosclerosis iniciálására és progressziójának fenntartására.

Atherosclerosis és inzulinrezisztencia

Jelenlegi álláspont

Az inzulinrezisztencia, az atherosclerosis és az NO közötti kapcsolatot vizsgáló tanulmányok elsősorban az endothelialis funkcióra fókuszálnak, vagyis az eNOS intact működését tartják központi fontosságúnak. Korábban kimutatták, hogy az inzulinérzékenység és az endothelium NO felszabadító képessége egymással kapcsolatban lévő jelenségek (Steinberg és mtsai 1996, Wohlin és mtsai 2003).

Korábbi kutatások eredményei alapján felmerült, hogy az inzulinérzékenység előfeltétele az endothelialis NO termelésének, ami alapvető meghatározója az intakt endothelfunkciónak. Az endothelialis dysfunctiót (az NO mediálta

vasodilatatio károsodását) az atheroscleroticus folyamatok korai fázisában megjelenő jelenségnek tartják, azonban jelenlétét leírták már az inzulinrezisztencia kapcsán is. A véráramlás fokozódása fiziológiásan tágítja a vázizom artériákat, azonban ez a hatása elmarad inzulinrezisztens állapotban. Az endothelialis dysfunctio és az inzulinrezisztencia kapcsolatát leírták obes (Steinbert és mtsai 1996) és hypertensiv (Suzuki és mtsai 2004) betegekben is. Inzulinérzékenyítő szer, például a metformin és a roziglitason alkalmazását követően az inzulinrezisztencia és az endothelialis dysfunctio párhuzamos javulása szintén oksági kapcsolatot vet fel. Stühlinger és munkatársai (2002) meggyőző bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a megemelkedett plazma ADMA-szint inzulinrezisztenciát és ezzel egyidejűleg endothel dysfunctiót okoz nem diabetesez egészséges önkéntesekben.

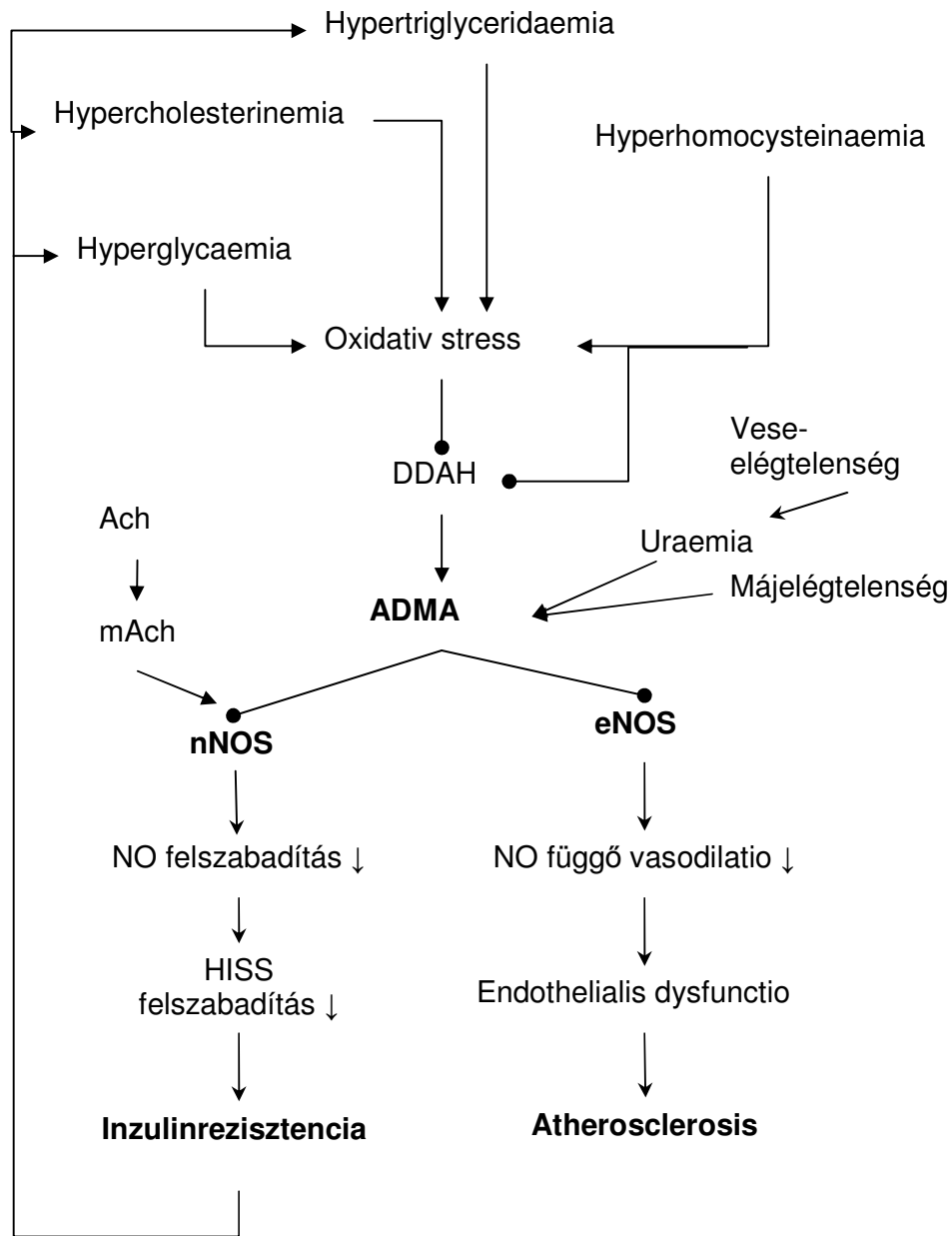
***Összegezve:** korábbi megfigyelések alapján az endothel dysfunctio és az inzulinrezisztencia közti kapcsolat háttérében az ADMA NOS gátló hatása állhat.*

Kutatási hipotézisünk

Kutatási hipotézisünkben felvetettük, hogy az ADMA azáltal, hogy gátolja a NOS neuronalis és endothelialis isoformáját, inzulinrezisztenciát és atherosclerost eredményez, vagyis az ADMA olyan molekula, mely felelős a két állapot párhuzamos kialakulásáért.

A hypercholesterinaemia, hyperlipidaemia, hyperglycaemia, II. típusú diabetes mellitus, uraemia, hypertonia, obesitas és a metabolicus syndroma talaján kialakult inzulinrezisztenciát az ADMA különböző mechanizmusok útján történő megemelkedése okozhatja (pl. oxidatív stressz, károsodott vesefunctió, stb), mely gátolva a neuronalis NO-szintet károsítja a postprandialis inzulinérzékenységet.

Másfelől, a fenti tényezők talaján kialakuló atheroscleroticus folyamatok az eNOS gátlásának eredményei. Fontos azt is megjegyezni, hogy az inzulinrezisztencia által okozott metabolicus eltérések tovább emelik a szisztémás ADMA koncentrációt, tehát gyorsítják mind az inzulinrezisztencia, mind az atherosclerost progresszióját (3. ábra).



3. ábra. Az ADMA szint emelkedése egyidejűleg okoz inzulinrezisztenciát és atherosclerოსist azáltal, hogy a NOS két izoformáját is (endothelialis és neuronális) gátolja. Figyelemreméltó az inzulinrezisztencia által triggerelt pozitív feedback mechanizmus (Ach acetilkolin, mACh muszkarinerg acetilkolin receptor)

A NOS két izoformája mellett, ahogy korábban már említettük, létezik egy harmadik is, az iNOS, amely gyulladásos állapotokban upregulálódva káros hatással rendelkezik. Ilyen pl. az atherosclerosis talaján kialakuló oxidatív stressz, ekkor ugyanis az NO átmenetileg szabályozatlanul szabadul fel (Buttery és mtsai

1996), melynek következményeként peroxinitritek alakulnak ki. Kiindulva abból, hogy az iNOS cytotoxicus és atherogen molekulák kialakulását teszi lehetővé, feltételezhető, hogy ez az enzim önmagában is triggerelheti ill. felerősítheti az atheroscleroticus folyamatot. Ahogy azt már korábban tárgyaltuk, a különböző izoformák által mediált hatások eltérésén túl az enzimek kinetikája is eltérő, mivel 3,9 $\mu\text{mol/L}$ ADMA szükséges az eNOS félmaximális gátlásához (Cardounel és munkatársa, 2002), miközben 1 $\mu\text{mol/L}$ ADMA már majdnem teljes mértékben gátolja az iNOS működését (Ueda és mtsai 2003). Ezekből a különbségekből kiindulva felvethető az, hogy az ADMA normál koncentrációja (0,35 és 1,0 $\mu\text{mol/L}$) esetleg védő hatást fejt ki olyan betegségekben, melyekben az iNOS aktív (pl. atherosclerosis), azáltal, hogy relatíve szelektíven csak ezt az izoformát gátolja. Ezt megerősíteni látszanak azok a korábbi preklinikai vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy egyes NOS gátlók gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek (Ianoiro és mtsai 1994). E megfontolásokból kifolyólag kutatásaink során megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e az ADMA protektív hatása az általunk elemzett populációban.

Kutatási hipotézisünk alapjai

A közelmúltban Lautt és munkatársai a táplálékfelvétel indukálta inzulin szenzitizáció egy új mechanizmusát írták le (Lautt és mtsai 2001). Felvetésük szerint a postprandialis hyperinsulinaemia a parasympathicus rendszer aktiválódása révén egy HISS-nek (hepaticus inzulin szenzitizáló substantia) elnevezett anyag felszabadulását és a szisztémás keringésbe jutását eredményezi. A HISS kizárólag a vázizmokat szenzitizálja az inzulin hypoglycaemisáló hatásai iránt, azaz nem hat olyan kiemelt jelentőségű helyeken, mint pl. a zsírszövet és a máj. Lautt munkacsoportja e parasympathicus reflex számos lépését azonosította már. Feltételezésük szerint a máj parasympathicus idegeinek aktiválódását követően acetilkolin szabadul fel, amely muscarinerg receptor mediációval NO szintézist indukál, a folyamat végeredményeként pedig HISS szabadul fel a májban (Guarino és mtsai 2004, Lautt 2004).

Ez a munkacsoport volt az első, amely számottevő bizonyítékot tudott szolgáltatni arra, hogy az NO-nak jelentős szerepe van az inzulinrezisztencia kialakulásában.

Kimutatták, hogy nem szelektív NOS gátlók intraportalis adása jelentős mértékű inzulinrezisztenciát eredményez, melyet intraportalisan adott 3-morpholinonydnonimine (nem enzimatis NO donor) felfüggeszt (Guarino és mtsai 2003, Sadri és mtsai 1999). Ez a hatás ugyanakkor NOS gátlók intravénás alkalmazása után elmaradt.

Ezzel párhuzamosan egy másik munkacsoport is vizsgálta a postprandialis inzulinérzékenység szabályozását. Kutatásaik további bizonyítékot szolgáltatottak a máj NO termelésének fontosságáról és a HISS felszabadulásától distalisan lévő mechanizmusokat tártak fel. Kimutatták, hogy az intraportalisan adott nitroglicerinnel inzulin szenzitizáló hatással rendelkezik előzetesen 7-nitronidazole (7-NI; szelektív nNOS gátló) intraportalis adásával inzulinrezisztensé tett nyulakon (Pórszász és mtsai 2002). Kísérleteik eredményeként arra a következtetésre jutottak, hogy a hepaticus parasymphathicus idegek aktiválódásának következtében felszabadult NO neuralis eredetű, vagyis az nNOS termeli. Ezen túlmenően felvetették, hogy az nNOS eredetű NO a plexus hepaticus anteriorban futó sensoros rostok aktiválásával neuropeptid felszabadulást eredményez, mely anyag a HISS-szel azonos. Összegezve: arra a következtetésre jutottak, hogy létezik egy olyan potens inzulinérzékenyítő mechanizmus, mely anatómiailag a plexus hepaticus anteriorhoz kötődik és mind a nem specifikus, mind a szelektív nNOS gátlással szemben nagyfokú érzékenységet mutat (Pórszász és mtsai 2002, Pórszász és mtsai 2003).

Klinikai bizonyítékok az inzulinrezisztencia és az atherosclerosis közötti kapcsolatra

Számos klinikai és epidemiológiai vizsgálat támasztja alá az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia kapcsolatát. Laakso és munkatársai (1991) rámutattak, hogy az asymptomatic atherosclerosis középkorú emberekben inzulinrezisztenciával társul, továbbá az inzulinrezisztencia olyan jelentős prediktora az atherosclerosis súlyosságának, mint a magas LDL koncentráció (Wang és mtsai 2002).

Más kutatócsoportok az IMT növekedése és az inzulinérzékenység közötti fordított arányosságról számoltak be (Bokemark és mtsai 2001, Agewall és mtsai 1995).

Kimutatták továbbá, hogy az inzulinrezisztencia a legerőteljesebb független rizikófaktora az a. carotis-fal megvastagodásának idősödő emberekben (Wohlin és mtsai 2003), hypertoniásokban (Suzuki és mtsai 2004; Suzuki és mtsai 1996) és diabeteses betegekben (Watarai és mtsai 1999).

Ezzel egybevégeően hypertoniás betegekben azt tapasztalták, hogy az inzulinrezisztencia az egyik legfontosabb meghatározója az endothelialis dysfunctio kialakulásának, mely utóbbit az atherosclerosis korai megjelenési formájának tekinthetünk (Wohlin és mtsai 2003).

Az inzulinrezisztencia együtt jár az IMT növekedésével (Fujiwara és mtsai 2003), így mind a prevalens, mind az incidens cardiovascularis betegségek független prediktora lehet II. típusú diabeteses betegekben (Bonora és mtsai 2002), hozzájárulva a II. típusú diabetes, a hyperlipidaemia, a hypertonia és a véralvadási zavarok által meg nem magyarázott kockázatokhoz. Az inzulinrezisztenciának tehát feltehetően jelentős szerepe van az atherosclerosis elindításában és a folyamat fenntartásában is (Arcaro és mtsai 2002).

Bár az inzulinrezisztencia és az atherosclerosis együttes előfordulásáról már évtizedekkel ezelőtt is beszámoltak, a két elváltozás kapcsolatának részleteit a mai napig nem sikerült tisztázni. Az ADMA plazma-szintjének emelkedéséről számoltak be több betegség kapcsán, ideértve az atherosclerost (Miyazaki és mtsai 1999), a hypertoniát (Stühlinger és mtsai 2002), a végstádiumú vesebetegséget (Kielstein és mtsai 2002, Wallace és mtsai 1992), a krónikus szívelégtelenséget (Chan és mtsai 2002), a II. típusú diabetes mellitust (Lin és mtsai 2002; Abbasi és mtsai 2001), a hypercholesterinaemiát (Böger 2003), a hyperhomocysteinaemiát (Böger és mtsai 2001) és a hyperlipidaemiát (Dayoub és mtsai 2003). Mások az ADMA-szint és az életkor (Miyazaki és mtsai 1999) valamint az ADMA és a csökkent glükóztolerancia (Böger 2003) közti pozitív korrelációról számoltak be.

Ennél egyértelműbb bizonyítékokkal szolgál a Stühlinger és munkatársai által elvégzett klinikai vizsgálat, melyben az inzulinérzékenység és a szisztémás ADMA-szint változását egyidejűleg vizsgálták. Jelentős kapcsolatot tártak fel az

ADMA plazma szintje és az inzulin szuppressziós teszt segítségével kvantifikált inzulinrezisztencia között. Vizsgálati eredményeik többszörös lineáris regressziós analízise során azt találták, hogy az egyensúlyi plazma glükóz koncentráció (az inzulinérzékenységet kvantifikáló paraméter) bizonyult az ADMA koncentráció legerőteljesebb prediktorának. Mindezek mellett hipertensív betegekben csak akkor találtak emelkedett ADMA-szintet, ha a betegek inzulinrezisztensek is voltak (Stühlinger és mtsai 2002).

3. Célkitűzések

Az ADMA szerepének meghatározása az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia kialakulásában

Klinikai evidenciák és NOS gátlók indukálta inzulinrezisztencia modellek alapján munkacsoportunk felvetette, hogy az ADMA az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia szimultán kialakulásáért felelős molekula, mivel egyaránt gátolja az eNOS-t és a plexus hepaticus anteriorban található nNOS-t, mely utóbbi az inzulinérzékenység szabályozásával hozható kapcsolatba (Zsuga és mtsai 2005). Ebből a hipotézisből kiindulva egy eset-kontroll vizsgálat keretén belül megvizsgáltuk az inzulinrezisztencia kialakulásának szignifikáns prediktorait atheroscleroticus betegekben, különös tekintettel az ADMA, a SDMA és az arginin szerepére. A vizsgálatba fiatal atheroscleroticus betegeket válogattunk be, a kontrollt pedig korcsoport-azonos, ép érrendszerű egyének képezték. A kimeneteli változó a HOMA index (Homeostasis Model Assessment of β cell function and insulin resistance) volt, amely az inzulinérzékenységet és béta-sejt funkciót összevontan kvantifikálja, tehát II. típusú diabetes mellitusban (a betegség végstádiumát kivéve, amelyben a béta-sejtek kimerülnek) az inzulinérzékenység mutatója.

Elemeztük az atherosclerosis, az inzulinrezisztencia és az ADMA-szint közötti korrelációt is. A különböző torzító tényezőkre való korrigálás elősegítése érdekében figyelembe vettük a korra, nemre, hypertóniára, diabetesre és dohányzásra vonatkozó adatokat is. Mértük az éhomi vércukor- és inzulin-szintet, a CRP-t (C reaktív protein), a homocisztein-szintet, a fehérvérsejt számot, a koleszterin-szintet, a triglycerid-szintet, továbbá elvégeztük a vese és májfunkciót jellemző vizsgálatokat is.

A megközelítőleg fiziológias ADMA szint szerepének vizsgálata az atherosclerosis kísértő gyulladásos állapotban

Az eNOS által termelt NO-t ubikviter antiatheroscleroticus molekulaként tartják számon. Az ADMA koncentráció emelkedése az eNOS gátlásán keresztül szignifikáns szerepet játszhat az atherosclerosis kialakulásában. Az ADMA azonban gátolja az iNOS-t is, mely izoforma atheroscleroticus folyamatokat triggerelhet peroxinitritek termelésén keresztül.

Ezen potenciálisan ellentétes hatásokból kiindulva megvizsgáltuk, hogy az ADMA rizikófaktor vagy protektív tényező-e a fiatal életkorban kezdődő emelkedett gyulladásos markerekkel kísért atherosclerosisban. Elemeztük az ADMA-szint kapcsolatát az artéria carotis communis intima-média vastagságával (IMT), amely a coronaria és cerebrovascularis szövődmények erőteljes prediktora. Tekintve, hogy az életkor mind az IMT-nek, mind pedig az artéria carotisok atherosclerosisának szignifikáns determinánsa (Mathiesen és mtsai 2001), eset-kontroll vizsgálatunkba 55 évnél fiatalabb, de legalább 30%-os artéria carotis interna szűkülettel rendelkező egyéneket vontunk be.

4. Anyagok és módszerek

Vizsgálatok fiatalkori carotis stenosisban és occlusióban

A jelen vizsgálatokat jóváhagyta a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága, továbbá minden résztvevő írásos beleegyezését adta a vizsgálatban történő részvételhez. A vizsgálat megfelelt a Helsink Deklarációban lefektetett elveknek.

1999. szeptember és 2001. november között 12 ezer beteget vizsgáltak meg a DOTE/DEOEC Neurológiai Klinika Neurosonológiai Laboratóriumában. A vizsgálatba bevont 55 évnél fiatalabb, az a. carotisok occlusiv betegségében szenvedő beteg közül a. carotis interna occlusiója 20 betegnek volt (átlagéletkor: $48,2 \pm 4,8$ év, férfi/nő: 18/2), 30%-nál súlyosabb arteria carotis interna stenosisa pedig 45 betegnek (átlagéletkor: $48,2 \pm 4,2$ év, férfi/nő: 23/22). Kontrollként 35 olyan hasonló korú és nemű személy szerepelt (átlagéletkor: $47,5 \pm 5,6$ év, férfi/nő: 17/18), akiknél a nyaki nagyereken sem szűkület, sem plaque nem volt detektálható carotis duplex ultrahanggal.

A carotis ultrahang vizsgálat napján részletes kérdőívet töltöttünk ki a cardiovascularis rizikófaktorokról, valamint éhgyomri vérvétel történt laboratóriumi vizsgálatok (vérkép, fibrinogén, homocisztein, lipidek, ADMA, SDMA, arginin, inzulin) elvégzése céljából. Minden beteg esetében carotis duplex vizsgálat történt online és offline IMT analízissel.

Vizsgálataink során az egyik fő kimeneti változó az IMT volt, melyet napjainkban már általánosan elfogadnak, mint az atheroscleroticus vascularis betegségek súlyosságának indikátorát (Bots 2006).

A másik fő kimeneteli változó az inzulinrezisztencia mértékét jellemző HOMA index volt. A betegeket akkor tekintettük inzulinrezisztensnek, ha a HOMA indexük meghaladta a 4,4-et (Wallace és mtsai 2004).

A vizsgálatok napján éhgyomorra és a reggeli gyógyszerek bevétele előtt reggel fél 8 és 8 óra között vérvétel történt. A fibrinogént plazmából határoztuk meg, a szérum mintákat a levételt követő 60 percen belül lefagyasztottuk és -70 fokon tároltuk a laboratóriumi mérések elvégzéséig. A haematologiai vizsgálatokat a korábban leírtaknak megfelelően végeztük (Magyar és mtsai 2003).

A glükóz-szintet párhuzamos vizsgálatokban határoztuk meg a glükóz oxidációs módszer segítségével (Beckman). Az elemzésekhez ezek számtani átlagát használtuk. Az inzulin-szintet az Insulin-CP (MP Diomedicals, NY, USA) kit segítségével határoztuk meg a gyártó által mellékelt utasításoknak megfelelően.

Az ADMA, SDMA és arginin koncentrációk meghatározása

Szilárd fázisú extrakció

A szérumminták előkészítését szilárd fázisú extrakcióval végeztük, Nonaka és mtsai (2005) módszerének adaptálásával a következők szerint: 250 µl szérumhoz belső standardként 50 µl homoarginint (1000 µmol/L, HARG) adtunk, majd 700 µl borát puffer I-gyel összekevertük. Az extrakciót megelőzően az SPE kolonnákat 1 ml borát puffer I-gyel (50 mmol/L bórsav, pH 9,00±0,05) kondicionáltuk. A mintafelvétel (1ml) után a kolonnákat 1 ml borát puffer I-gyel, 3 ml ionmentes vízzel, végül 1 ml metanollal mostuk. Ezután az arginin származékokat 1 ml eluenssel (tömény ammónia, víz és metanol (10/40/50/v/v/v)) eluáltuk. Az alkalmazott vákuum végig 750 mbar volt (ILMVAK MPC 101 Z vákuum pumpa és ILMVAK VCZ 324 szabályozó egység). Az így kapott oldatot 60 °C-os vízfürdőn, nitrogén atmoszféra alatt, vákuum alkalmazásával szárazra pároltuk, ezután a száraz extraktumot 200 µl ionmentes vízben oldottuk. A mintaelőkészítést 12 munkahelyes SPE mintaelőkészítő berendezéssel végeztük (BAKER SPE 12 G manifold, J.T. Baker).

Származékképzés

A származékképzést a Molnár-Perl és munkatársai által kidolgozott módszer

(1999) adaptálásával végeztük. A 200 µl vízben oldott mintáinkat 63 µl ortoftálaldehid/merkaptopropionsav (OPA/MPA, pH 9,9) reagens oldat hozzáadása után 22 °C-on 10 percig állni hagytuk, majd a készülék 5 °C-os mintatartójába helyeztük. A származékképzőt mindig 22 °C-ra való felmelegedés után használtuk.

Kromatográfias körülmények

Az elválasztást Waters Alliance 2695 típusú nagynyomású folyadékkromatográfias készüléken, a detektálást pedig Waters 2475 fluoreszcenciás detektorral végeztük. A mintákból 20 µl-t injektáltunk. A kolonnatér hőmérséklete a mérés teljes ideje alatt 35 °C volt. Waters Symmetry C-18 (4,6 mm x 150 mm x 3,5 µm) kolonnát használtunk.

Az eluens áramlási sebessége 1,00 ml/perc volt. A gradiens elúció a következőképpen változott: 0-13 perc közt 90% A eluens (20 mmol/L ammónium-karbonát pH 7,50 ± 0,05), 10% B (acetonitril), 13-15 perc közt lineáris gradiens szerint 70% A, 30% B, majd az összetétel 5 percig tartotta ezt az arányt, és utána 20-20,1 perc közt visszaállt a kiindulási 90% A, 10% B összetételre és tartotta ezt a mérés végéig.

Az analízis során a detektor gerjesztési hullámhossza (λ_{ex}) 337 nm, emissziós hullámhossza (λ_{em}) 520 nm volt az arginin és a homoarginin detektálásáig, ezután az emissziós hullámhossz 454 nm-re váltott, ezen a hullámhosszon detektáltuk az ADMA-t ill. a SDMA-t. A mérést és kiértékelést Waters Empower szoftverrel végeztük.

Linearitás

A minta a következőképpen készült: számított térfogatú standard oldathoz (1000 µmol/L Arg, 100-100 µmol/L ADMA ill. SDMA) 200 µl belső standard (1000 µmol/L HArg) oldatot adtunk és borát puffer I.-gyel 1 ml-re kiegészítettük, majd ehhez 315 µl OPA/MPA származékképzőt adtunk.

Visszanyerés

A mintaelőkészítést a standard addíciós módszerrel végzett visszanyerés segítségével vizsgáltuk. Azonos szérum mintákhoz eltérő mennyiségben adtunk törzsoldatot és belső standardot. A minták összetételét mutatja az 1. táblázat.

1. táblázat. A visszanyerésnél alkalmazott mintaösszetétel

sorsz.	szérum (μl)	ADMA ($10\ \mu\text{mol/L}$) (μl)	SDMA ($10\ \mu\text{mol/L}$) (μl)	Arg ($1000\ \mu\text{mol/L}$) (μl)	HArg ($1000\ \mu\text{mol/L}$) (μl)	borát puffer I. (μl)
1.	250	0	0	0	200	550
2.	250	0	0	0	200	550
3.	250	0	0	0	200	550
4.	250	2	2	20	200	526
5.	250	2	2	20	200	526
6.	250	2	2	20	200	526
7.	250	4	4	45	200	497
8.	250	4	4	45	200	497
9.	250	4	4	45	200	497

Reprodukálhatóság

A mintaelőkészítés reprodukálhatóságának meghatározása során ugyanazt a szérum mintát két különböző személy készítette elő 6-6 mintaszámmal.

Felhasznált anyagok

L-arginine hydrochloride (Arg), L-homoarginine hydrochloride (HArg), NG,NG-dimethyl-L-arginine dihydrochloride (ADMA) és NG,NG'-dimethyl-L-arginine di(p-hydroxyazobenzene-p'-sulfonate) só (SDMA) a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) származott. Az ortoftálaldehidet (OPA) a Flukatól; 3-merkaptopropionsavat (MPA) és a bórsavat az Aldrichtől; ammónium-karbonátot, kálium-kloridot és a nátrium-hidroxidot a Reanaltól (Budapest, Hungary) szereztük be. A metanol (MeOH) és az acetonitril (HPLC tisztaságú) a Scharlautól származott. A szérum extractióhoz szükséges szilárd fázisú extrakciós oszlopokat (OASIS® MCX 3cc) a

Waterstől szereztük be (Milford, MA, USA).

Ultrahang vizsgálat

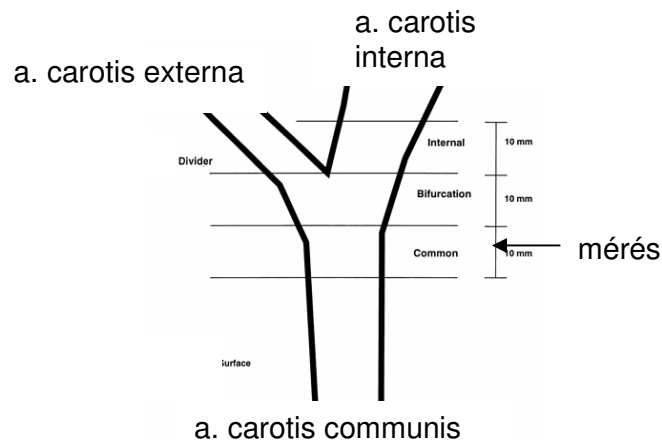
Színkódolt carotis duplex vizsgálat

A nyaki nagyereket 7,5 MHz-es lineáris szondával, Sonos 2000 color duplex ultrahang készülékkel (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) vizsgáltuk. A duplex ultrahang során a vizsgált erekről longitudinális és transzverzális B-mód felvételeket készítettünk, valamint az arteria carotis communisban, a maximális stenosis helyén és az arteria carotis internában systolés csúcssebességet és végdiastolés sebességet mértünk (Widder és mtsai 1986). A vizsgálatról minden esetben videofelvételt készítettünk. A stenosis mértékét 10%-os kategóriákban írtuk le a nemzetközileg elfogadott kritériumok alapján (Görtler és mtsai 1996, Carpenter és mtsai 1996, Bray és Glatt 1995). A kevesebb, mint 50%-os stenosis okozó szűkületek klasszifikálását a B-módú képen mért lumenredukció alapján végeztük. 50%-os stenosisnak a maximális stenosis helyén mért 120 cm/s-os systolés csúcssebességet tekintettük. Indirekt hemodinamikai jelek (a stenosis maximumán az áramlási spektrumban turbulens áramlás, poststenotikus csökkenő áramlási sebesség) jelenléte esetén 80%-osnál súlyosabb stenosiszt írtunk le. Occlusiót akkor diagnosztizáltunk, amikor a vizsgált érben a stenosisztól distalisan nem volt detektálható áramlás, valamint jelen voltak az occlusióra jellemző indirekt hemodinamikai kritériumok (fordított áramlás az a. ophthalmicában).

IMT mérés

Az a. carotis communis IMT online mérését a carotis duplex vizsgálat során, Sonos 2000 color duplex ultrahang készülékkel (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), kétszeresére nagyított, kimerevített B-mód képeken végeztük az a. carotis bulbustól proximálisan 10 mm-re. Minden mérés a szonda medio-lateralis pozíciójában, a szondától távol eső érfalon, end-diastolében történt. A carotis

duplex vizsgálatról minden esetben videó felvételt készítettünk. Az a. carotis communis IMT offline analízisét az Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) protokoll alapján végeztük (Howard és mtsai 1993). A carotis bulbustól proximálisan 1 cm-es szakaszon milliméterenként 1-1 mérést végeztünk, azaz carotisonként 11, betegenként 22 értéket kaptunk (4. ábra). Minden beteg esetében a 22 érték átlagát (átlag offline IMT) használtuk a statisztikai elemzéshez. A vizsgálatunkban az offline IMT analízist egy független vizsgáló végezte. Az offline analízis „vakon” történt, azaz a vizsgáló nem tudta, hogy a videofelvétel melyik betegcsoportba tartozó személyről készült.



4. ábra. Az a. carotis bifurcatiojának sematikus ábrája. Az offline IMT mérés az a. carotis communis distalis 10 mm-es szakaszán, mm-ként, azaz enként 11 ponton történt.

Az inzulinrezisztencia meghatározása

Az egyik általunk vizsgált fő kimeneti változó a HOMA index volt. A HOMA index az inzulinrezisztencia jellemzésének egyszerű noninvazív és megbízható módja, amely jól korrelál a teljes test inzulinérzékenységének kvantifikálására elfogadott aranystandard eljárás, a hyperinsulinaemiás euglycaemiás glükóz clamp által szolgáltatott eredményekkel, ugyanakkor rutin klinikai körülmények között is könnyen meghatározható. A HOMA indexet az éhgyomri vércukor- és inzulin-szintből az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$HOMA = \frac{\text{plazmaglükóz}(mmol / L) * \text{plazmainzulin}(\mu U / mL)}{22,5}$$

A statisztikai elemzés során, ahol módszer azt kívánta meg, a HOMA indexet folytonos változóként használtuk, máshol pedig dichotomisálást követően, amikor is a beteget inzulinrezisztensnek minősítettük 4,4 vagy efeletti HOMA index mellett és inzulinérzékenynek 4,4 alatti HOMA index esetén (Wallace és mtsai 2004).

Statisztikai elemzés

Alapstatisztikák

Az eseteket és a kontrollokat alapvető tulajdonságaik és a rizikófaktor-profilok alapján hasonlítottuk össze. A mintaátlagokat illetve az előfordulási gyakoriságokat mind az atherosclerosis, mind az inzulinérzékenység alapján kettéosztott mintában meghatároztuk. A folytonos változók normalitását a Shapiro-Wilk teszt segítségével vizsgáltuk. Normál elosztás esetén Student t-teszt segítségével végeztük az összehasonlítást, a gyakoriságokat pedig a Pearson χ^2 teszttel hasonlítottuk össze. Amennyiben az eloszlás nem volt normális, a Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk.

A HOMA index által jellemzett inzulinérzékenység vizsgálata

Explorációs lineáris regressziós eljárást végeztünk annak érdekében, hogy a HOMA indexet meghatározó tényezőket figyelembe vevő többszörös lineáris regressziós modellt tudjunk alkalmazni és ezen determinánsok hatásait a modell által megadott koefficiensek segítségével jellemezhessük. Ennek érdekében először egyszerű lineáris regressziót végeztünk az inzulinrezisztencia lehetséges determinánisaival, ide értve a szérum kreatinin-szintet, az életkort, a nemet, a triglycerid-szintet, a koleszterin-szintet, a HDL-C-szintet, az LDL-C-szintet, az Apo-A1-szintet, az Apo-B-szintet, az Lp(a) -szintet, a glükóz-szintet, az inzulin-szintet, a diabetes mellitust, az ischaemiás szívbetegséget, a hypertóniát, a cerebrovasculáris megbetegedéseket, a dohányzási szokásokat, az újonnan

azonosított rizikófaktorokat (CRP, fibrinogén, homocisztein) és az általunk vizsgálni kívánt lehetséges befolyásoló tényezőket (szérum ADMA, SDMA, arginin, valamint az ADMA/SDMA és az arginin/SDMA arány).

A kiindulási többszörös modellt a szakirodalomban fontosnak tartott meghatározók, valamint az egyszerű modell által szignifikánsnak jelzett determinánsok (a regressziós koefficiens nullától eltérő értéket vett fel $P < 0,05$ mellett) együttes vizsgálatával hoztuk létre. Ennek megfelelően az alábbi tényezőket vettük be a kiindulási modellbe: életkor, nem, hypertensio, dohányzás, diabetes mellitus, kreatinin-szint (valamennyien előzetes irodalmi adatok alapján), továbbá ADMA/SDMA arány, szérum triglycerid, HDL-C, Apo-A1-szint és korábbi cerebrovascularis megbetegedés az anamnesisben (utóbbiak az egyszerű modellezés alapján). Hiányzó értékek esetén indikátor kódolást végeztünk. A változókat egyszerre vittük be a kiindulási modellbe, majd a nem szignifikáns determinánsokat egyesével kivettük a modellből.

A végső modell tartalmazta az összes a priori (szakirodalmi) változót, továbbá az ADMA/SDMA arányt, a HDL-C és triglycerid szinteket, valamint a cerebrovascularis betegséget az anamnesisben.

Az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia közötti kapcsolat vizsgálatához az adatok elemzését a minta rétegzését követően is elvégeztük. A rétegeképző változó az a. carotis atherosclerosisának jelenléte vagy hiánya volt, azaz két rétegre bontottuk a mintát, az atherosclerostól mentes és az atheroscleroticus rétegre.

A kapcsolatokat a regressziós koefficiensekkel és ezek 95%-os konfidencia intervallumával jellemeztük. A statisztikai elemzést a Stata 8.2 (Stata Corporation) szoftverrel végeztük.

Az IMT és az ADMA szint kapcsolatának vizsgálata

Az IMT és az ADMA közti korrelációt Spearman féle korreláció-elemzés segítségével határoztuk meg. Emellett egyszerű lineáris regressziós elemzést is végeztünk az IMT lehetséges prediktoraival, ide értve a tradicionális

rizikófaktorokat (életkor, nem, triglycerid, koleszterin, HDL-C, LDL-C, Apo-A1, Apo-B, Lp(a) szint, diabetes mellitus, ischaemiás szívbetegség, hypertonia, dohányzás), továbbá az újonnan azonosított rizikófaktorokat (CRP, fibrinogén, homocisztein) és a szérum ADMA, SDMA és arginin szinteket. Az egyéb tényezőket (fehérvérsejt szám, thrombocytá szám, szérum kreatinin-szint, szérum glükóz-szint, valamint thrombocytá aggregatio gátlók szedése) szintén figyelembe vettük. Minden szignifikáns tényezőt egy többszörös lineáris regressziós modellbe vontunk be annak érdekében, hogy kvantifikáljuk az a. carotis communis IMT és a szérum ADMA koncentráció közti kapcsolatot. Előzetes irodalmi ismereteink alapján az életkor, a nem, a szérum koleszterin-szint, a hypertonia és a diabetes mellitus került be a többszörös modellbe. Hiányzó értékek esetén indikátor kódolást végeztünk. A változókat egyszerre vittük be a modellbe, majd ezt követően azon nem szignifikáns változókat, melyek nem járultak hozzá a modellhez, egyenként eltávolítottuk. Ennek megfelelően a végső modell tartalmazta az összes a priori azonosított tényezőt, illetve az atherosclerosis jelenlétét vagy hiányát, az arginin-szintet, a CRP-szintet, a fibrinogén-szintet, a HDL-C-szintet, a fehérvérsejt számot és a thrombocytá aggregatio gátló használatát.

Mind a Spearman korreláció elemzést, mind a többszörös lineáris regressziót elvégeztük az adatok rétegzését követően is. A rétegző változó az a. carotis interna atherosclerosisának megléte vagy hiánya volt.

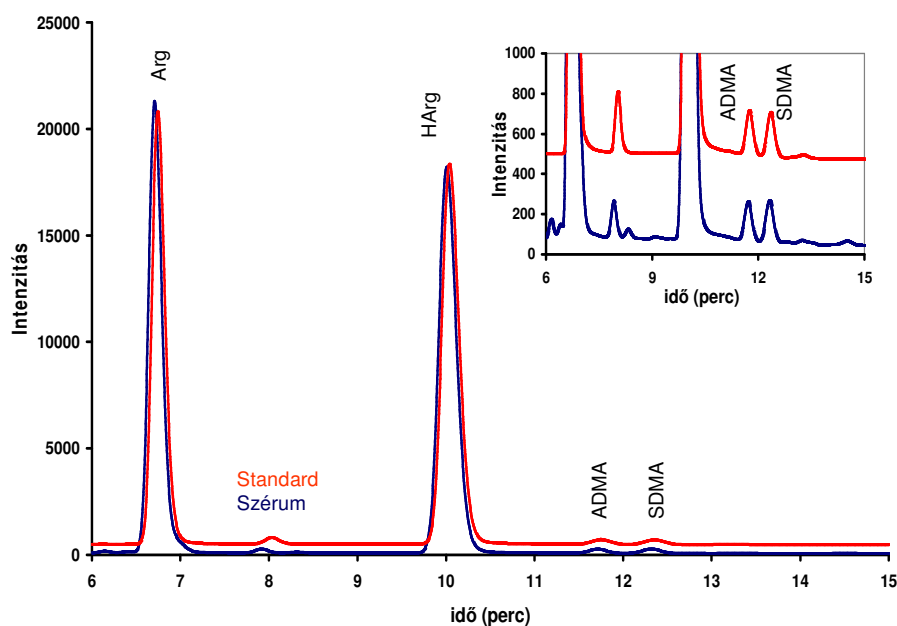
A kapcsolatokat itt is a regressziós koefficiensekkel és ezek 95%-os konfidencia intervallumával jellemeztük. A statisztikai elemzést a Stata 8.2 (Stata Corporation) szoftverrel végeztük.

5. Eredmények

A szérum ADMA mérésére szolgáló módszer jellemzése

Kvalitatív meghatározás

A kvalitatív meghatározás során olyan stabilis mérési módszert fejlesztettünk ki, amely egymástól élesen elváló ADMA, SDMA, arginin és homoarginin csúcsokat eredményezett. A minőségi meghatározás standard oldatok injektálásával történt. A komponensek standard oldatban és humán szérumban való elválását mutatja az 5. ábrán látható mintakromatogramm.



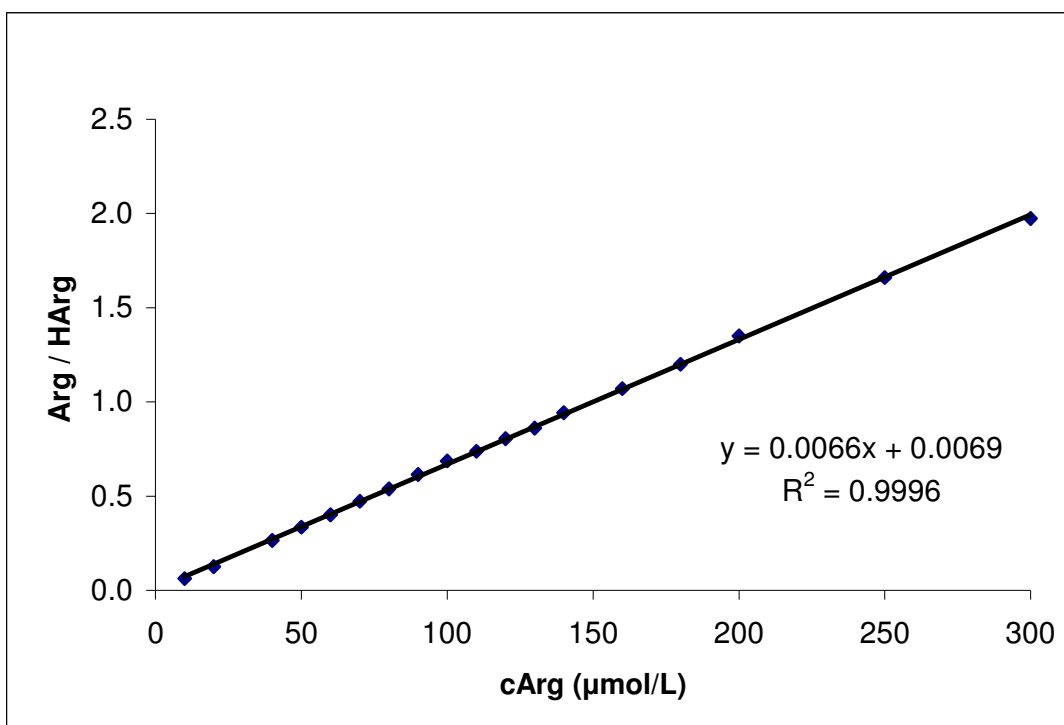
5. ábra. A standard és a szérum mintakromatogramja.

A szérum mintákban a komponensek retenció idejének standard deviációja az argininnél 0,020 , a homoargininnél 0,036 , az ADMA-nál 0,076 , a SDMA-nál 0,108 volt.

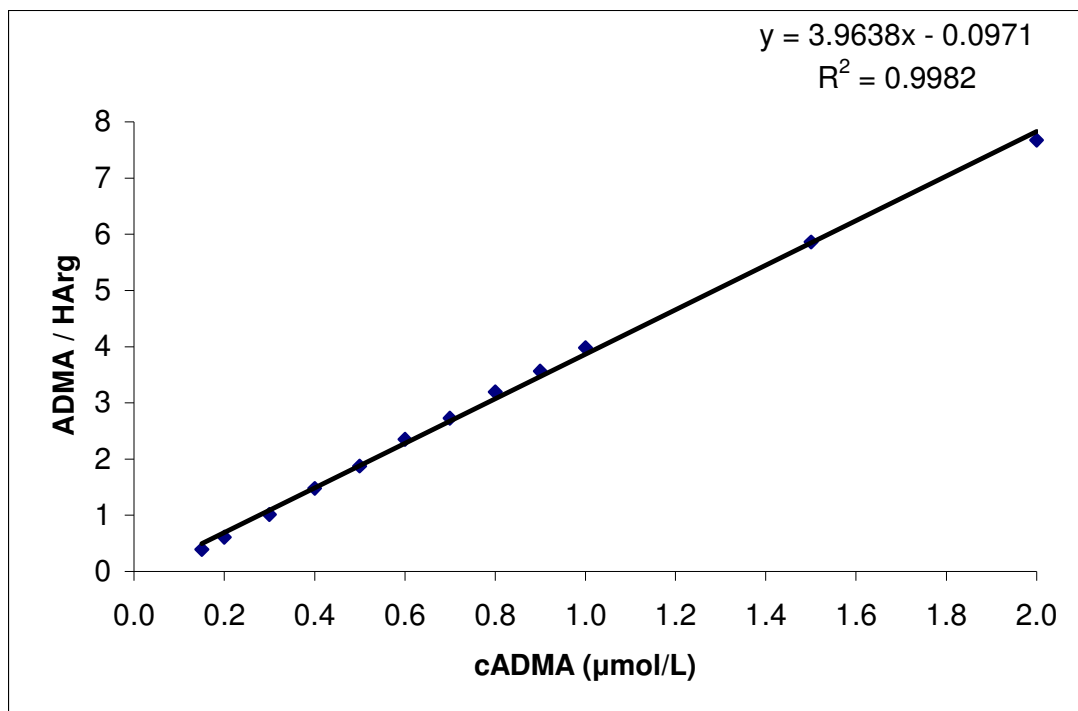
Linearitás

A mintabeli arginin és a metilált származékok kvantifikálásához megvizsgáltuk, mely tartományban lineáris a detektor kimenő jele az egyes komponensekre.

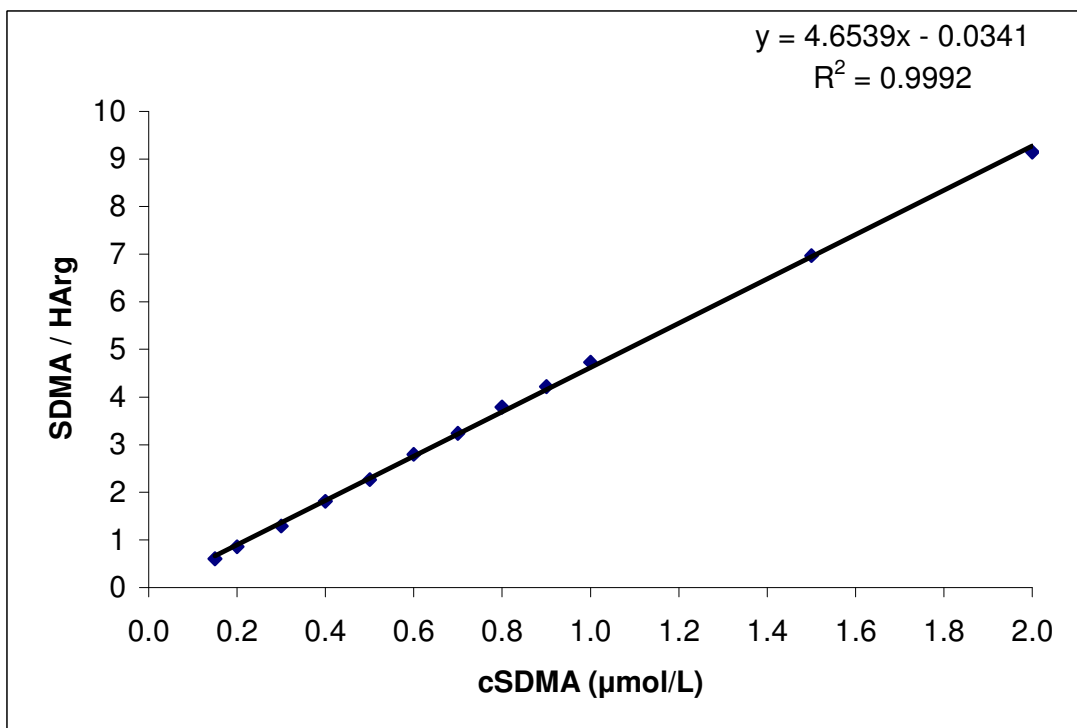
A 6. ábrán a vizsgált anyag és a homoarginin (mint beslő standard) görbe alatti területének hányadosát ábrázoltuk a vizsgált anyag koncentrációjának függvényében. A kalibrációs függvények alapján látható, hogy a lineáris koncentráció-tartomány arginin esetén 10-300 $\mu\text{mol/L}$ (6. ábra A panel), ADMA esetén 0,15-2,0 $\mu\text{mol/L}$ (6. ábra B panel), míg SDMA esetén 0,15-2,0 $\mu\text{mol/L}$ között mozgott (6. ábra C panel). A lemerített 90 szérumban az arginin koncentrációja 56-132 $\mu\text{mol/L}$, az ADMA koncentrációja 0,18-0,64 $\mu\text{mol/L}$, és az SDMA koncentrációja 0,18-0,97 $\mu\text{mol/L}$ között változott. Ezt a tartományt minden esetben a kalibrációs görbe lineáris szakaszára esett.



6. ábra A panel. Az arginin kalibrációs egyenese.



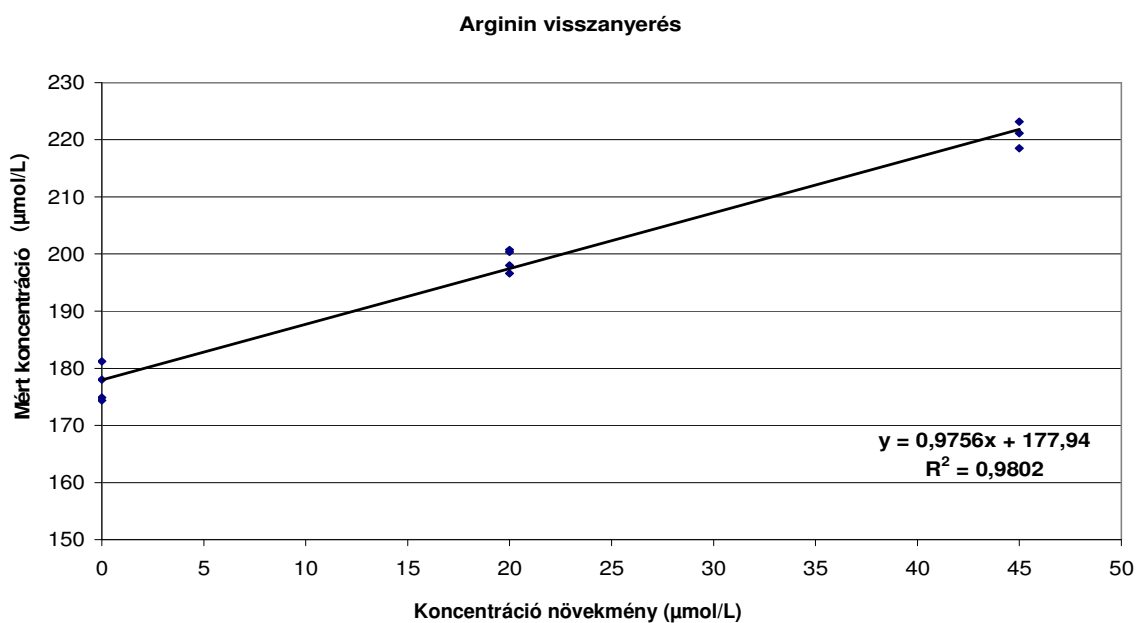
6. ábra B panel. Az ADMA kalibrációs egyenese.



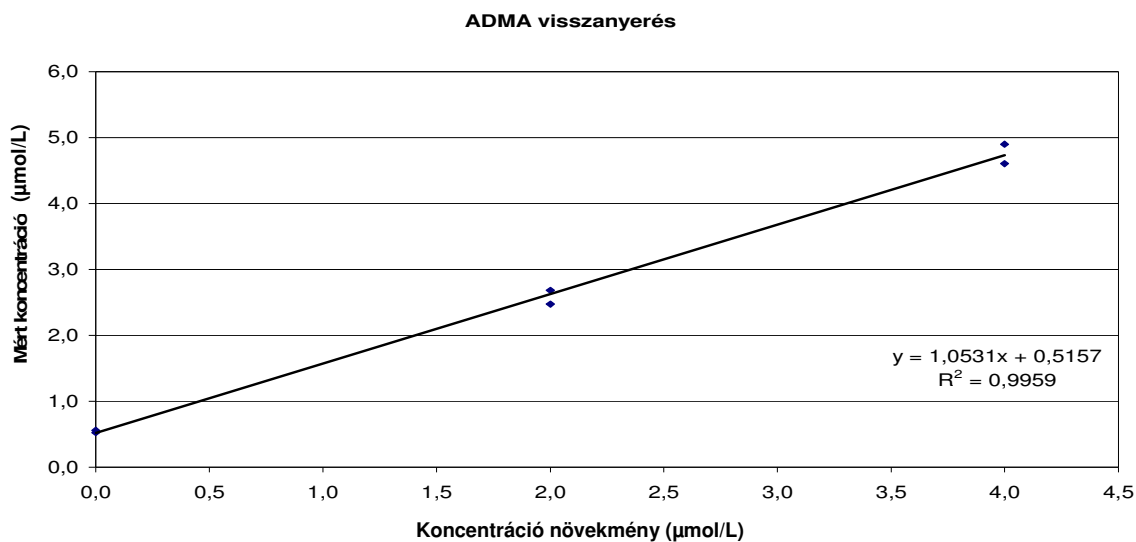
6. ábra C panel. Az SDMA kalibrációs egyenese.

Visszanyerés meghatározása standard addícióval

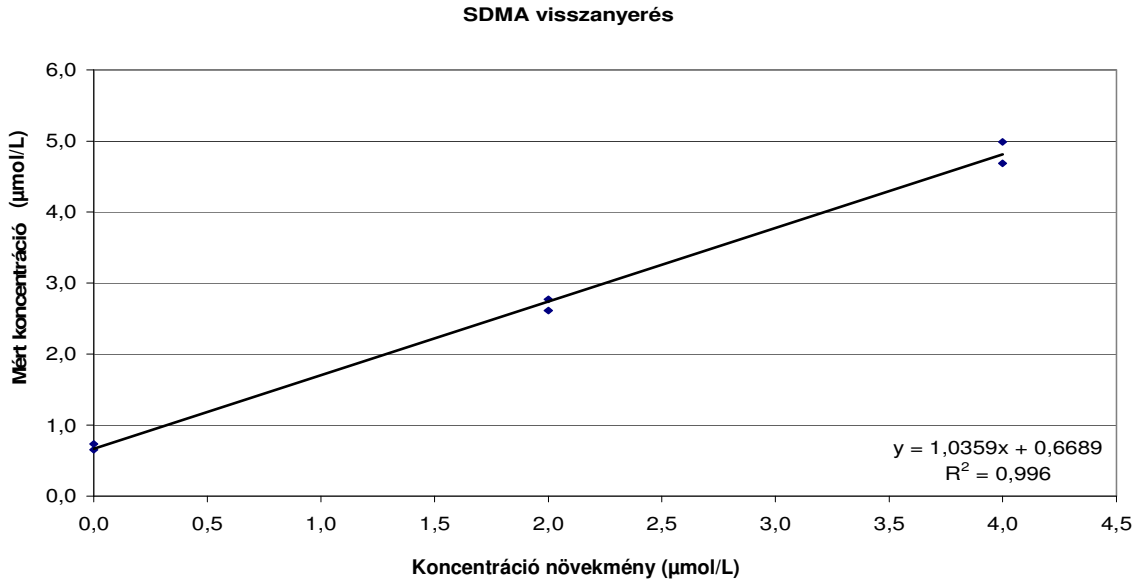
Standard addíciós módszerrel vizsgáltuk a szérum mátrixhatását, továbbá azt, hogy mennyi anyagot veszítettünk a szilárd fázisú extrakció során. A visszanyerés tehát megmutatja a mintaelőkészítés megbízhatóságát (7. ábra).



7. ábra A panel. Az arginin visszanyerése.



7. ábra B panel. Az ADMA visszanyerése.



7. ábra C panel. A SDMA visszanyerése.

Megállapítottuk, hogy a mintaelőkészítés megbízhatóságát jellemző visszanyerés mindhárom komponensre nagyobb volt 97,5 %-nál.

Reprodukálhatóság

A mintaelőkészítés és a mérés reprodukálhatóságának meghatározása során ugyanazt a szérummintát két független személy 6-6 mintaszámmal készítette elő. A koncentráció közvetlen kalibrációval történő meghatározásával a komponensek koncentrációinak szórása a területértékek szórásértékeivel egyezett meg (2. táblázat). Belső standard használatával a mintaelőkészítés során fellépő hibák csökkentésével, a belső standardra vonatkoztatott koncentrációk szórása csökkenthető volt, ezért ezzel a módszerrel határoztuk meg a koncentrációkat.

A 12 mintából származó reprodukálhatóság szórása belső standard alkalmazásával, koncentrációértékek alapján, arginin-re: 2,2 %, ADMA-ra: 2,1 %, SDMA-ra: 1,2 % volt.

2. táblázat. A mintaelőkészítés és mérés reprodukálhatósága.

Név	Terület (10 ⁷ mV*s)				Koncentráció (µmol/L)			
	Arg	HArg	ADMA	SDMA	Arg	HArg	ADMA	SDMA
P101	191,6	191,3	1,648	2,101	149,2	200	1,574	1,598
P102	195,9	201,9	1,724	2,156	144,4	200	1,564	1,568
P103	194,8	198,3	1,578	2,144	146,3	200	1,490	1,581
P104	199,0	201,7	1,729	2,216	146,9	200	1,569	1,599
P105	194,2	200,5	1,714	2,214	144,2	200	1,565	1,605
P106	198,0	201,6	1,712	2,232	146,2	200	1,558	1,607
P201	204,9	211,1	1,866	2,397	144,5	200	1,602	1,635
P202	212,2	223,6	1,965	2,525	141,3	200	1,596	1,629
P203	199,5	212,7	1,858	2,359	139,5	200	1,589	1,609
P204	193,6	200,8	1,820	2,255	143,6	200	1,630	1,623
P205	203,2	215,9	1,853	2,379	140,0	200	1,570	1,602
P206	209,0	223,5	1,926	2,474	139,4	200	1,574	1,607
Átlag	199,6	206,9	1,783	2,288	134,8	200	1,57	1,61
% RSD	3,2	5,0	6,5	5,9	2,2	0	2,1	1,2

A dimetilarginin-szint változása inzulinrezisztenciában és atherosclerosisban

Az inzulin szenzitív és inzulinrezisztens betegek demográfiai jellemzése és rizikóprofilja

Az általunk végzett vizsgálatban résztvevő inzulinrezisztens és inzulinérzékeny betegek demográfiai jellemzőit és laboratóriumi paramétereit a 3. táblázatban foglaltuk össze. A vizsgálati mintában az átlagéletkor 50,7 év volt, az inzulinrezisztens betegek valamennyivel fiatalabbak voltak, mint az inzulinérzékeny csoport betegei (49,73 évvel szemben 51,09 év). A férfiak és a nők megoszlásában nem mutatkozott különbség, nem volt közöttük eltérés az a. carotisok atherosclerosisában, a diabetes, a szívbetegség, a hypertonia, a dohányzás, a cardiovascularis betegségek előfordulásában és a thrombocytá

aggregáció gátlók alkalmazási gyakoriságát illetően sem. A cerebrovasculáris megbetegedések gyakoribbak voltak az inzulinrezisztens betegek anamnesisében, mint a kontrollokéban.

Az átlagos ADMA szint $0,40 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/L}$ volt (95% KI: 0,39; 0,42). Az inzulinérzékeny csoportban az ADMA szint $0,41 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/L}$ (95% KI: 0,39; 0,43), míg az inzulinrezisztens rétegben $0,39 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/L}$ (95% KI: 0,36; 0,43) volt. Az ADMA-hoz hasonlóan az arginin szintje sem mutatott kapcsolatot az inzulinérzékenységgel. Ezzel szemben a szérum SDMA-szint szignifikánsan alacsonyabb volt az inzulinrezisztens betegek körében ($0,31 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/L}$ 95% KI: 0,27, 0,35), mint az az inzulinérzékenyeknél ($0,37 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/L}$ 95% KI: 0,34, 0,39). Ennek megfelelően az arginin/ADMA arány változatlan, az ADMA/SDMA arány pedig szignifikánsan magasabb volt az inzulinrezisztens betegeknél az inzulinérzékenyekkel összehasonlítva.

A szérum kreatinin-szint nem volt statisztikailag szignifikánsan eltérő az inzulinérzékeny és az inzulinrezisztens betegek között (3. táblázat). A lipid homeostasis kóros eltérései gyakoribbak voltak az inzulinrezisztens csoportban, ezt tükrözte az, hogy a triglycerid koncentráció szignifikánsan magasabb, míg az Apo-A1 és a HDL-C szint szignifikánsan alacsonyabb volt az inzulinrezisztens egyéneknél.

3. táblázat. Az inzulinérzékeny és inzulinrezisztens betegek jellemzői és rizikófaktor profilja. A vizsgált paramétereket cella frekvenciával, vagy az átlag \pm SD megadásával jellemeztük. A p érték, normális eloszlású paraméterek esetén a t-teszt, cella frekvenciák esetén pedig a Pearson χ^2 teszt szignifikanciáját jelzi.

Jellemző	Inzulinérzékeny	Inzulinrezisztens	P
	n=64	n=26	
Életkor (években)	51,09 \pm 3,39	49,73 \pm 3,63	0,047
Nem (férfi/nő)	37/27	14/12	0,73
ADMA (μ mol/L)	0,41 \pm 0,09	0,39 \pm 0,09	0,25
SDMA (μ mol/L)	0,37 \pm 0,12	0,31 \pm 0,09	0,017
Arginin (μ mol/L)	88,17 \pm 14,54	89,22 \pm 16,21	0,38
ADMA/SDMA	1,15 \pm 0,22	1,33 \pm 0,31	0,017
Arginin/ADMA	223,37 \pm 47,5	232,74 \pm 49,3	0,80
A metabolikus szindróma komponensei			
Triglycerid (mmol/L)	1,68 \pm 1,14	2,49 \pm 1,62	0,004
HDL-C (mmol/L) férfiakban	1,41 \pm 0,46	1,09 \pm 0,27	0,016
HDL-C (mmol/L) nőkben	1,44 \pm 0,39	1,15 \pm 0,32	0,009
Hypertonia (igen/nem)	35/28	20/6	0,059
Éhomi vércukor (mmol/L)	4,35 \pm 0,46	5,6 \pm 1,82	<0,001
Egyéb tényezők			
Kreatinin (μ mol/L)	94,44 \pm 102,8	76,16 \pm 13,0	0,78
Inzulin (μ IU/mL)	14,71 \pm 3,65	39,78 \pm 23,51	<0,001
Cholesterin (mmol/L)	5,61 \pm 1,12	5,52 \pm 0,76	0,35
LDL-C (mmol/L)	3,48 \pm 1,03	3,36 \pm 0,84	0,31
Apo-A1 (g/L)	1,6 \pm 0,33	1,42 \pm 0,25	0,007
Apo-B (g/L)	1,11 \pm 0,32	1,15 \pm 0,25	0,26
Lp(a) (mg/L)	355,8 \pm 494,2	302,1 \pm 342,8	0,3
CRP (mg/L)	5,8 \pm 20,03	6,42 \pm 5,39	0,44
Homocisztein (μ mol/L)	13,47 \pm 5,17	12,5 \pm 4,61	0,2
Atherosclerosis (igen/nem)	40/24	20/6	0,19
Diabetes (igen/nem)	3/61	3/23	0,25
Cerebrovascularis betegség (igen/nem)	18/46	13/13	0,048
Szívbetegség (igen/nem)	14/50	10/16	0,11
Thrombocytá aggregáció gátló szedése (igen/nem)	35/29	16/10	0,8
Dohányzás (igen/nem)	31/33	11/15	0,6

A HOMA index és a szérum ADMA/SDMA arány quantificálása egyszerű és többszörös lineáris regressziós modell segítségével

Az inzulinérzékenység szignifikáns determinánsait a 4. táblázat mutatja be.

4. táblázat. A HOMA index determinánsai az egyszerű lineáris regresszió alapján.

Jellemző	Koefficiens (β)	95% konfidencia intervallum		p
		Alsó határ	Felső határ	
ADMA (100 nmol/L)	-0,043	-1,30	1,21	0,95
SDMA (100 nmol/L)	-0,91	-1,86	0,047	0,062
Arginin (μ mol/L)	0,002	-0,07	0,075	0,95
ADMA/SDMA	7,44	3,49	11,4	<0,001
Arginin/ADMA	-0,007	-0,23	0,22	0,95
Homocisztein (μ mol/L)	0,026	-0,19	0,24	0,81
Kreatinin (μ mol/L)	-0,004	-0,019	0,012	0,625
Triglycerid (mmol/L)	1,17	0,39	1,95	0,004
Cholesterin (mmol/L)	-0,29	-1,36	0,78	0,59
LDL-C (mmol/L)	-0,025	-0,13	0,076	0,62
HDL-C (mmol/L)	-3,99	-6,47	-1,51	0,002
Apo-A1 (g/L)	-3,82	-7,20	-0,45	0,027
Apo-B (g/L)	1,02	-2,63	4,68	0,58
Lp(a) (mg/L)	-0,0003	-0,003	0,002	0,80
CRP (mg/L)	0,02	-0,045	0,083	0,56
Inzulin (μ IU/mL)	0,28	0,26	0,3	<0,001
Glükóz (mmol/L)	2,66	1,92	3,39	<0,001
Kor (év)	-0,033	-0,35	0,28	0,83
Nem	-0,37	-2,56	1,82	0,74
Atherosclerosis	1,33	-0,96	3,62	0,25
Diabetes	2,85	-1,49	7,19	0,20
Cerebrovascularis betegség	3,34	1,16	5,52	0,003
Szívbetegség	1,99	-0,43	4,42	0,105
Hypertensio	2,35	0,15	4,56	0,037
Dohányzás	-1,63	-3,78	0,52	0,14

Az egyszerű lineáris regresszió eredményei alapján figyelemre méltó a SDMA és az inzulinrezisztencia között fennálló szignifikáns negatív korreláció (β : - 0,55, 95% KI: - 1,6, -0,44; $p=0,033$), továbbá a kapcsolat hiánya az ADMA és az inzulinrezisztencia között. Ennek megfelelően az inzulinrezisztencia és az ADMA/SDMA arány között szoros pozitív korreláció látható, amely az összes szignifikáns prediktor és a priori azonosított zavaró tényezővel való korrigálás után is szignifikáns maradt (β : 6,76, 95% KI: 2,13, 11,39; $p=0,005$) (5. táblázat, A panel). Érdekes módon ez a kapcsolat még kifejezettebbé vált, amikor az atheroscleroticus réteg adatait önállóan elemeztük (β : 8,29, 95% KI: 1,43, 15,15; $p=0,019$) (5 táblázat B panel), ugyanakkor nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az a. carotison található atherosclerostól mentes egyének csoportjára korlátozva a vizsgálatot (β : 1,39, 95% KI: -5,46, 8,26; $p=0,671$).

5. táblázat A és B panel A HOMA index determinánsai a többszörös lineáris regresszió alapján, a teljes mintában (Panel A) és a carotis atheroscleroticus betegek körében (Panel B).

Panel A

Jellemző	Koefficiens (β)	95% konfidencia intervallum		p
		Alsó határ	Felső határ	
ADMA/SDMA	6,76	2,13	11,39	0,005
Nem	1,59	-0,72	3,90	0,173
Kor (év)	-0,10	-0,41	0,21	0,514
Dohányzás	-1,59	-3,71	0,52	0,137
Hypertensio	1,11	-1,23	3,45	0,347
Diabetes	2,69	-2,03	7,40	0,260
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	-0,32	-5,93	5,28	0,909
Triglycerid (mmol/L)	0,13	-2,57	2,83	0,925
LDL-C (mmol/L)	-0,30	-1,39	0,80	0,593
HDL-C (mmol/L)	-3,82	-11,40	3,76	0,318
Apo-A1 (g/L)	3,28	-6,02	12,57	0,485
Cerebrovascularis betegség	1,75	-0,78	4,27	0,172

Panel B

Jellemző	Koefficiens (β)	95% konfidencia intervallum		p
		Alsó határ	Felső határ	
ADMA/SDMA	8,29	1,43	15,15	0,019
Nem	1,23	-2,93	5,39	0,553
Kor (év)	-0,01	-0,56	0,54	0,965
Dohányzás	-1,69	-5,40	2,03	0,364
Hypertensio	0,98	-3,53	5,49	0,662
Diabetes	4,39	-3,24	12,03	0,252
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	1,33	-12,86	15,52	0,851
Triglycerid (mmol/L)	-0,15	-8,73	8,43	0,972
LDL-C (mmol/L)	-0,08	-1,80	1,65	0,928
HDL-C (mmol/L)	-4,76	-16,73	7,21	0,426
Apo-A1 (g/L)	4,20	-10,88	19,28	0,576
Cerebrovascularis betegség	2,01	-1,99	6,02	0,325

A közel normális szérumszintű ADMA-szint hatásának vizsgálata az IMT által jellemzett cardiovascularis morbiditásra

Az arteria carotis atherosclerosisával rendelkező egyének és a korcsoport-azonos kontrollok demográfiai jellegzetességei és rizikófaktorai

A teljes vizsgálati mintában az átlagéletkor 50,7 év volt. Az életkor viszonylatában nem volt szignifikáns különbség az esetek és a kontrollok között. A nők és a férfiak azonos eloszlást mutattak, nem volt eltérés a diabetes és a szívbetegség prevenciójában, azonban a hypertonia, a dohányzás, a cardiovascularis megbetegedések és a thrombocytá aggregatio gátlók használata gyakoribb volt az atheroscleroticus betegek körében, mint a kontrollokéban (6. táblázat).

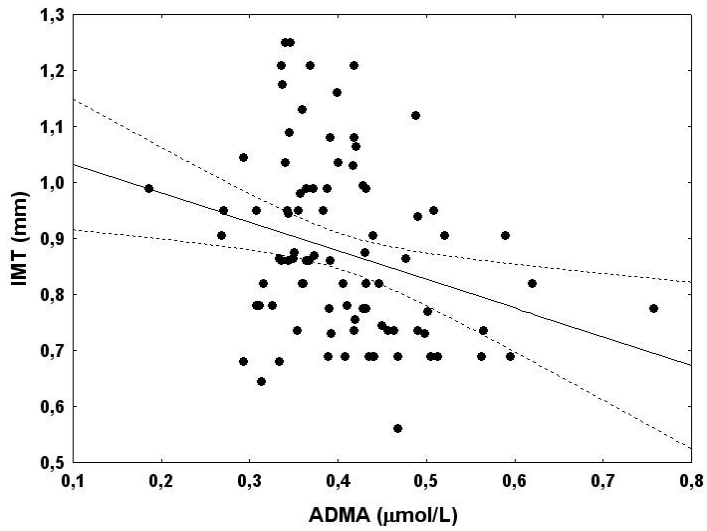
Az ADMA-szint és az IMT közötti kapcsolat a teljes beteg populációban, valamint atherosclerosis jelenlétében illetve hiányában

A teljes mintában az átlagos szérumszintű ADMA szint $0,403 \pm 0,009 \mu\text{mol/L}$ volt (95% KI: 0,385, 0,421), míg $0,395 \pm 0,085 \mu\text{mol/L}$ (95% KI: 0,373, 0,417) értéket vett fel

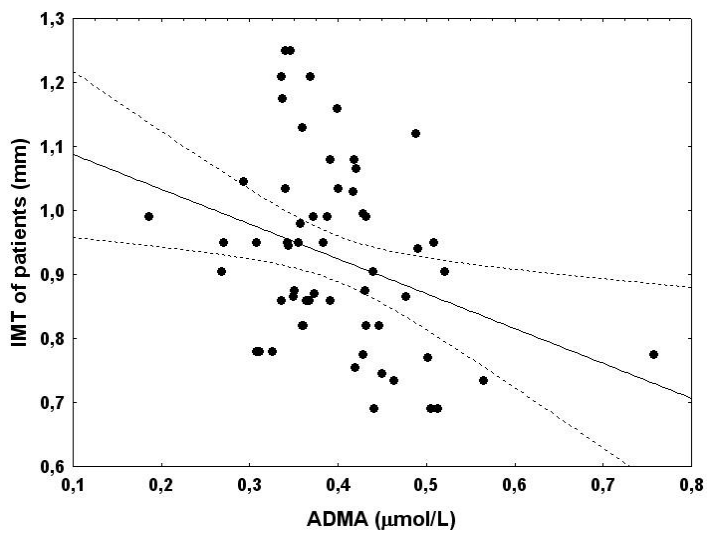
az atheroscleroticus betegek körében, és $0,419 \pm 0,088$ $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: 0,386, 0,452) volt a nem atheroscleroticus csoportban. Az IMT és az ADMA szint között erőteljes negatív korreláció mutatkozott a teljes adatbázis adatainak elemzését követően (Spearman korelációs koefficiens: -0,300, $p=0,0041$) és az atheroscleroticus rétegben (Spearman korelációs koefficiens: -0,323, $p=0,012$). Ezzel szemben nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció az atherosclerostól mentes csoportban (8. ábra).

6. táblázat. A demográfiai jellegzetességek és a rizikófaktor profil az atheroscleroticus és az atherosclerostól mentes egyének körében.

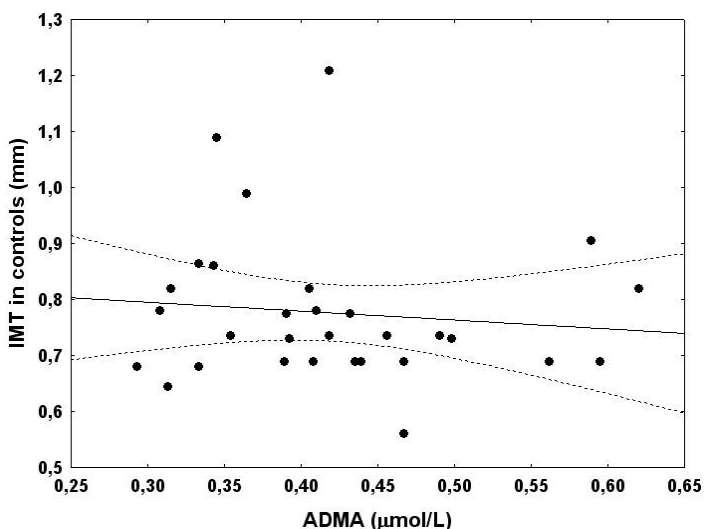
Jellemző	Atherosclerostól mentes (n=30)	Atheroscleroticus (n=60)	p
Életkor (években)	50,16	50,96	0,15
Nem (férfi/nő)	15/15	36/24	0,37
Diabetes (igen/nem)	1/29	5/55	0,36
Hypertensio	12/18	43/16	0,003
Dohányzás (igen/nem)	6/24	36/24	<0,001
Szívbetegség (igen/nem)	2/28	29/31	<0,001
Thrombocyta aggregáció gátló használata (igen/nem)	9/21	43/17	<0,001
IMT mm	$0,77 \pm 0,13$	$0,93 \pm 0,15$	<0,001
ADMA $\mu\text{mol/L}$	$0,42 \pm 0,088$	$0,39 \pm 0,085$	0,89
SDMA $\mu\text{mol/L}$	$0,37 \pm 0,096$	$0,34 \pm 0,12$	0,08
Arginin $\mu\text{mol/L}$	$85,34 \pm 15,34$	$90,04 \pm 14,64$	0,08
Homocisztein $\mu\text{mol/L}$	$11,76 \pm 4,87$	$13,92 \pm 4,96$	0,023
Cholesterin mmol/L	$5,48 \pm 0,89$	$5,65 \pm 1,09$	0,19
Kreatinin $\mu\text{mol/L}$	$82,7 \pm 13,51$	$91,96 \pm 103,07$	0,35
Triglycerid mmol/L	$1,67 \pm 0,85$	$2,02 \pm 1,51$	0,12
LDL-C mmol/L	$3,28 \pm 0,87$	$3,53 \pm 1,02$	0,14
HDL-C mmol/L	$1,39 \pm 0,357$	$1,3 \pm 0,44$	0,82
Lp(a) mg/L	$250,73 \pm 258,52$	$385,06 \pm 522$	0,093
Fibrinogén g/L	$3,09 \pm 0,52$	$3,74 \pm 0,86$	0,001
Fvs szám G/L	$6,06 \pm 1,033$	$7,46 \pm 1,79$	0,001
CRP mg/L	$2,46 \pm 1,86$	$7,742 \pm 20,72$	0,084
Glükóz mmol/L	$4,4 \pm 0,55$	$4,86 \pm 1,37$	0,04



8. ábra A panel. A szérum ADMA szintje és az IMT közötti kapcsolatot jellemző szóródás diagramm a teljes vizsgálati populációt tekintve.



8. ábra B panel. A szérum ADMA szintje és az IMT közötti kapcsolatot jellemző szóródás diagramm az atheroscleroticus réteget vizsgálva.



8. ábra C panel. A szérums ADMA szintje és az IMT közötti kapcsolatot jellemző szóródás diagramm az atherosclerostól mentes populációt vizsgálva.

Az IMT és a szérums ADMA szint közti kapcsolat jellemzése egyszerű és többszörös lineáris regressziós módszerek segítségével

Az egyszerű lineáris regresszió alapján az IMT-t meghatározó szignifikáns tényezőket a 7. táblázat tartalmazza. Az egyszerű lineáris regressziót követően többszörös lineáris regressziót végeztünk az IMT és a szérums ADMA szintje közti kapcsolat jellemzésére. A két tényező közti szignifikáns negatív kapcsolat továbbra is szignifikáns maradt az összes szignifikáns prediktorral illetve az a priori meghatározott tényezőkkel történt korrigálást követően is (β : -0,51, 95% KI: -0,894, - 0,127; $p=0,010$). Érdekes módon ez a negatív kapcsolat még kifejezettebbé vált az atheroscleroticus rétegre korlátozva az elemzést (β : -0,67, 95% KI: -1,16, - 0,18; $p=0,008$), ezzel szemben nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az atherosclerostól mentes betegek vizsgálatakor (β : -0,367, KI: -1,31, 0,576; $p=0,418$). Ezen túlmenően azt találtuk, hogy az ADMA koncentrációján kívül a korábban felállított atherosclerosis diagnózis is szignifikánsan kapcsolódott az IMT növekedéséhez (β : 0,094, KI: 0,014, 0,17; $p=0,022$), míg a szérums HDL-C szintje védelmet biztosított, vagyis negatívan korrelált az IMT-vel (β : -0,081, KI: -0,156, - 0,006; $p=0,035$) mind a teljes adatbázisban (β : -0,11, KI: -0,21, - 0,021; $p=0,018$), mind csak az

atheroscleroticus rétegben.

7. táblázat. Az IMT-t meghatározó tényező egyszerű lineáris regresszió alapján.

Jellemző	Koefficiens (β)	95% konfidencia intervallum		p
		Alsó határ	Felső határ	
ADMA	-0.51	-0.88	-0.14	0.007
CRP	0.0022	0.0003	0.0041	0.021
Homocisztein	0.0093	0.0028	0.016	0.005
Fvs szám	0.03	0.012	0.049	0.001
Apo-A1	-0.143	-0.24	-0.04	0.007
HDL-C	-0.094	-0.17	-0.016	0.018
Fibrinogén	0.035	-0.005	0.075	0.086
Férfi nem	0.09	0.035	0.163	0.003
Atherosclerosis	0.15	0.089	0.213	0.000
Thrombocyta aggregációk használata	0.064	-0.005	0.133	0.071
Szívbetegség	0.067	-0.001	0.136	0.054
Hypertensio	0.063	-0.003	0.13	0.065

6. Megbeszélés

A jelen vizsgálat legfontosabb megfigyelése, hogy korai kezdetű atherosclerosisban szenvedő betegekben az ADMA/SDMA arány pozitív korrelációt mutat a HOMA indexszel, az inzulinérzékenységet és béta-sejt funkciót összevontan kvantifikáló mutatóval. Emellett fordított arányosságot találtunk e két paraméter között az atherosclerostól mentes egyéneknél. Az, hogy a szignifikáns pozitív korrelációt csak az atheroscleroticus rétegben tudtuk kimutatni, alátámasztja kutatási hipotézisünket, mely szerint a dimetilált arginin származékok az inzulinrezisztencia és az atherosclerosis kialakulásáért felelős folyamatok csomópontjában találhatók.

További megfigyelésünk, hogy a National Cholesterol Education Adult Treatment Panel III. kritériumainak megfelelően (Haffner és mtsai 2006) az inzulinrezisztens egyéneknél magasabb triglycerid- és éhgyomri vércukor-szint alakult ki csökkent LDL-cholesterin-szint mellett. Mindezeknél az inzulinrezisztens betegek körében alacsonyabb volt az Apo-A1-szint is (az inzulin rezisztens állapotokban kialakult lipid anyagcsere változásokat Ginsberg és mtsai foglalták össze (2005)).

Az adatok áttekintése során azt találtuk, hogy inzulinrezisztenciában az ADMA/SDMA arány növekedése a SDMA-szint csökkenéséből fakad, miközben az ADMA-szint gyakorlatilag változatlan.

Számos mechanizmus járulhat hozzá a SDMA-szint csökkenéséhez inzulinrezisztenciában, így például a SDMA csökkent cellularis felvétele vagy fokozott eliminációja. Korábban beszámoltak arról, hogy hyperinsulinaemiában indukálódik az y^+ transzporterek expressziója, és mivel ez a mechanizmus az elsődleges az arginin, az ADMA és a SDMA cellularis felvételében, ez hozzájárulhat a SDMA koncentráció csökkenéséhez (Nijveldt és mtsai 2003b, Simmons és mtsai 1996). Mivel e három szubsztrát mindegyike kompetitíve gátolja a másik két molekula bejutását a sejtbe, korábban felmerült, hogy a NOS gátló hatástól mentes SDMA is limitálhatja az NO szintézist azáltal, hogy gátolja

az arginin felvételét (Closs és mtsai 1997). A SDMA ugyanakkor gátolja a direkt NOS inhibitor ADMA celluláris felvételét is, erről az oldalról tehát a SDMA segíti a NOS működését. Egyéb adat híján (legjobb tudomásunk szerint nem ismert pl. az y^+ transporterek ADMA-val és SDMA-val szembeni affinitása sem) nehéz megmondani, hogy az alacsonyabb SDMA koncentráció és a kisebb inzulinérzékenység közül melyik az ok és melyik az okozat, esetleg minnek az okozatai mindketten. Kísérleti eredményeink minden esetre azt a koncepciót támasztják alá, mely szerint a SDMA inkább protektív hatású az inzulinrezisztenciával szemben, hiszen a szérum inzulin-szint negatívan korrelál a SDMA-szinttel, ugyanakkor nincs szignifikáns kapcsolat sem az ADMA, sem az arginin esetében (az adatokat nem közöltük).

Ettől függetlenül még egy mechanizmus járulhatna hozzá a SDMA-szint csökkenéséhez: a fokozott vesén keresztüli elimináció, amely a prediabeticus és diabeticus állapotban kialakuló hyperfiltratio eredményeként alakulhatna ki (Chen és mtsai 2006; Pistrosch és mtsai 2005). Ennek a felvetésnek azonban ellentmond, hogy vizsgálatainkban a szérum kreatinin-szinttel jellemzett vesefunkció nem tér el az atheroscleroticus és a kontroll csoportban. Másfelől, Siroen és munkatársai kimutatták, hogy a máj képes mind az ADMA, mind a SDMA szisztémás keringésből történő eliminációjára, tehát az a nézet, mely szerint a SDMA kizárólag renalisán eliminálódik, megdőlni látszik (Siroen és mtsai 2005). Ezeket az eredményeket azok a megfigyelések is alátámasztják, melyek szerint létezik egy alternatív mechanizmus a dimetilargininek metabolizálására, mely eredményeként α_2 -ketosav analógok jönnek létre (Ogawa és mtsai 1987). Kiindulva abból, hogy a máj központi szerepet játszik a glükóz homeostasisban, felvethető, hogy a SDMA májban történő metabolizmusa upregulálódik inzulinrezisztenciában, ezáltal a SDMA eliminációja fokozódik.

Az ADMA-szint és az inzulinrezisztencia közötti kapcsolat hiánya ellentmond a Stühlinger és munkatársai által tett megfigyeléseknek, akik erőteljes pozitív korrelációt mutattak ki a plazma ADMA koncentráció és az egyensúlyi állapotban mért plazma glükóz koncentrációval jellemzett inzulinrezisztencia között, mely kapcsolatot függetlennek találták más rizikófaktoroktól (Stühlinger és mtsai 2002; McLaughlin és mtsai 2006). Korábban mi is felvetettük, hogy az ADMA

inzulinrezisztenciát okozhat az nNOS gátlásán keresztül, mialatt az ezzel egyidejűleg kialakuló atherosclerosis az eNOS gátlásának tulajdonítható (Zsuga és mtsai 2005). Ez a hipotézis nem-szelektív és szelektív nNOS gátlók által létrehozott állatkísérletes inzulinrezisztencia modellek eredményein alapult, mely modellekben az igen potens inzulinérzékenyítő mechanizmus, az étkezés által indukált inzulin szenzitizáció szenvedett zavart. Ez a mechanizmus a plexus hepaticus anterior sensoros rostjaihoz kapcsolt (Lautt és mtsai 2004). Ezen felül különböző preklinikai és klinikai vizsgálatok mutatták ki az ADMA atherogenesisben betöltött szerepét (Miyazaki és mtsai 1999, Böger és Zoccali 2003, Böger 2003, Wang és mtsai 2006). Mindezek ellenére más munkacsoport is beszámolt arról, hogy (eredményeinkhez hasonlóan) nem találtak szignifikáns eltérést az ADMA-szintek között, amikor ép és károsodott endothelialis funkciójú coronariákkal rendelkező betegeket hasonlítottak össze (a HOMA index ugyanakkor szignifikánsan nagyobb volt az endothel dysfunccióval rendelkező betegek esetében) (Elesber és mtsai 2006).

Felvethető ugyan, hogy a HOMA index nem tisztán az inzulinrezisztencia mutatója, mivel a β -sejt funkció is befolyásolja, azonban epidemiológiai vizsgálatokban az inzulinrezisztencia jellemzésére szolgáló validált markerként tartják számon (Wallace és mtsai 2004, Rabasa-Lhoret és mtsai 2001, Bonora és mtsai 2000). Ez azzal függhet össze, hogy az inzulinnal szembeni válaszkészség II. típusú diabetes mellitus esetén illetve az ahhoz vezető metabolikus változások során bír a legnagyobb jelentőséggel, ugyanakkor az inzulintermelés képessége illetve vércukor általi szabályozása csak a jóval ritkább I. típusú diabetes mellitusban és a II. típusú diabetes mellitus végstádiumában szenved komolyabb zavart.

Kiindulva abból a tényből, hogy a sztereoizomer ADMA és SDMA egymással is verseng a sejtbe való bejutásért az y^+ transzporterén keresztül, továbbá jelen eredményeink ismeretében felvetjük, hogy az ADMA/SDMA arány jobban jellemzi a sejtbe bejutó ADMA mennyiségét, mint az ADMA-szint önmagában. Ebből következik, hogy az ADMA/SDMA arány növekedését az ADMA koncentráció relatív növekedéseként foghatjuk fel. Vagyis, a SDMA-szint csökkenése változatlan ADMA-szint mellett hozzájárulhat mind az inzulinrezisztencia, mind az

atherosclerosis kialakulásához, ugyanis gyengül a SDMA gátló hatása az ADMA y^+ carrier általi transzportjára. Ennek eredményeként az ADMA sejtbe történő fokozott felvétele az eNOS illetve nNOS fokozott gátlásához és ezáltal az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia nagyobb mértékű indukciójához vezet.

Azon eredményünk, mely szerint atherosclerosisban az ADMA/SDMA arány az egyetlen szignifikáns determinánsa az inzulinrezisztenciának, tovább hangsúlyozza, hogy az ADMA fontos szerepet játszik mindkét betegség evolúciójában (Zsuga és mtsai 2005).

Vizsgálati elrendezésünk egyik hiányossága, hogy adatbázisunk nem tartalmazott adatokat a testtömeggel, a csípő körfogattal, illetve a BMI-vel kapcsolatban, mely tényezők szorosan kapcsolódnak az inzulinrezisztencia jelenlétéhez, mivel a konszenzus ajánlások ezek segítségével definiálják a metabolikus szindrómát. Tekintve azt a tényt, hogy jelen vizsgálatunk célja nem a metabolikus szindróma lehetséges meghatározó tényezőinek vizsgálata volt, hanem a teljes testet figyelembe vevő inzulinrezisztenciából fakadó eltérések elemzése, úgy érezzük, hogy a jelen vizsgálat megfelelő ezen problémák feltárására.

Összefoglalva: az ADMA/SDMA arány szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a HOMA indexszel a korai kezdetű atheroscleroticus betegeknek. Ennek alapján úgy érezzük, hogy az ADMA/SDMA arány az y^+ transporterek szintjén történő kompetíció figyelembevételével az ADMA intracellularis szintjének adekvát indikátora, ezen keresztül pedig hasznos jellemzője az inzulinérzékenységnek.

Második kísérleti célkitűzéseink kapcsán végzett vizsgálataink legjelentősebb eredménye az volt, hogy a szérum ADMA koncentráció fiatal atheroscleroticus betegekben fordítottan arányos az IMT-vel, mely utóbbit a cardiovascularis betegségek lefolyásának elemzésében mint helyettesítő végpontot használnak.

Jelenleg az ADMA-t a veseelégtelenségben szenvedő betegeknek mint nem tradicionális cardiovascularis rizikófaktort kezdik figyelembe venni. Ezen túl az ADMA általánosságban is az atherosclerosis által okozott betegségteher egyik diagnosztikus markerévé válhat, mivel a felgyülemelő bizonyítékok az eNOS

gátlásán keresztül kifejtett atherogen hatását mutatják (Fliser és mtsai 2005). Ez utóbbi felvetés azonban elsősorban végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek adatainak elemzésére támaszkodik, akiknek a szérum (vagy plazma) ADMA-szintje a normál tartományt jelentősen meghaladja, azaz 2 és 10 $\mu\text{mol/L}$ közötti értéket vesz fel (Kielstein és mtsai 2005). Az ezen belül eső koncentrációk már elegendőek ahhoz, hogy az eNOS-t gátolják, hiszen ahogy azt már korábban tárgyaltuk, az eNOS K_i értéke az ADMA viszonylatában 3,9 $\mu\text{mol/L}$ endothelialis sejtkultúrákban vizsgálva (Cardounel és mtsai 2002). A jelen vizsgálatban résztvevő betegeknél azonban a vesefunkció károsodása nem volt megfigyelhető, továbbá az általunk vizsgált két csoportban (carotis atherosclerosisra rendezettek ill. nem rendezettek) sem mutatkozott szignifikáns eltérés a szérum kreatininszintekben.

Mialatt az eNOS vizsgálata a kutatások középpontjába került, az iNOS vizsgálata a háttérben maradt. Az iNOS különböző gyulladásos állapotokban, pl. az atherosclerosis talaján kialakuló fokozott oxidatív stresszben upregulálódik, ami összességében káros lehet, mivel az ilyenkor nagy mennyiségben keletkező NO-ból cytotoxicus és atherogen peroxiniterek keletkeznek (Buttery és mtsai 1996).

A két izoforma gátolhatósága is eltérő: 3,9 $\mu\text{mol/L}$ ADMA az eNOS félmaximális gátlását hozza létre (Cardounel és mtsai 2002), ugyanakkor 1 $\mu\text{mol/L}$ ADMA az iNOS-t majdnem teljesen gátolja (Ueda és mtsai 2003). Ebből kiindulva felvethető, hogy az ADMA a normál koncentráció-tartományban (0,35-1,0 $\mu\text{mol/L}$) illetve minimálisan előttről (1-2 $\mu\text{mol/L}$) védő hatású lehet olyan állapotokban, melyben az iNOS indukálva van. Ezt látszanak alátámasztani azok a preklinikai eredmények, melyek a NOS gátlók gyulladáscsökkentő hatásáról számoltak be gyulladásos oedema modellben egereken (Iano et al. 1994).

Kutatási hipotézisünknek megfelelően azt találtuk, hogy a szérum ADMA-szint negatívan korrelál az IMT-vel. Ez a fordított kapcsolat kifejezettebbé vált, amikor az elemzést csak az atheroscleroticus rétegre korlátoztuk.

Munkacsoportunk korábban beszámolt arról, hogy a korai kezdetű a. carotis atherosclerosis gyulladásos folyamatokkal jár együtt, melyet számos, a

gyulladásra jellemző szérum marker szintjének emelkedése mutatott (CRP, fehérvérsejt szám, fibrinogén és Lp(a)) (Magyar és mtsai 2003). A jelen vizsgálatban a homocisztein és számos gyulladásos marker (fehérvérsejt szám, fibrinogén) szignifikánsan emelkedett volt atherosclerosisban (a CRP a statisztikai szignifikanciát csak megközelítette), ezek alapján tehát feltételezzük, hogy gyulladásos folyamatok aktiválódtak az általunk jelenleg vizsgált fiatal atheroscleroticus betegek populációjában is.

Abból kiindulva, hogy a gyulladás és a hyperhomocysteinaemia önmagában is elegendő az iNOS indukálásához (Tyagi és mtsai 2005), továbbá abból, hogy korábban leírták már az iNOS indukcióját az a. carotis interna atherosclerosisában (Cromheeke és mtsai 1999, Wilcox és mtsai 1997, Buttery és mtsai 1996), feltételezhető, hogy az iNOS a mi vizsgálatunk atheroscleroticus betegeiben is indukálva van és kifejti atherogen aktivitását.

Tudomásunk van egy, a mi eredményünknek ellentmondó vizsgálatról is, melyben az IMT és az ADMA között pozitív korrelációt írtak le egészséges egyéneknél, akiknél az atherosclerosis nem állt fent (Miyazaki és mtsai 1999), továbbá két másik vizsgálatról, melyek semmilyen jellegű kapcsolatot nem igazoltak e két paraméter között (Tagawa és mtsai 2004, Lundman és mtsai 2001). Az ellentmondást az eltérő vizsgálati populációknak tulajdonítjuk. Mi viszonylag fiatal és atheroscleroticus betegeket vizsgáltunk kor és nem szerint illesztett kontrolljaikkal összehasonlítva, a másik három vizsgálatban azonban a betegek kora (amellyel ismert az IMT pozitív korrelációja) magasabb felső értékig terjedt ki (Tagawa és mtsai 2004, Miyazaki és mtsai 1999), és/vagy a betegekben nem emelkedtek a gyulladásos markerek illetve nem szenvedtek atherosclerosisban (Tagawa és mtsai 2004, Lundman és mtsai 2001, Miyazaki és mtsai 1999). Számos olyan vizsgálat is van, ahol veseelégtelenségben szenvedő betegeknél igazolták az ADMA és az IMT közötti pozitív kapcsolatot. Veseelégtelenségben azonban az ADMA koncentrációja meghaladhatja az eNOS 3,92 és 4,22 $\mu\text{mol/L}$ közötti IC_{50} értékét, ami atheroscleroticus folyamatok aktiválásán keresztül járul hozzá az IMT növekedéséhez (Nanayakkara és mtsai 2005, Zoccali és mtsai 2002, Zoccali 2002).

A HDL-C-szint és az IMT vastagság között megfigyelt negatív korreláció egyezik a korábban végzett vizsgálatok eredményeivel. Junyent és munkatársai (2006) hasonló eredményeket kaptak familiáris hypercholesterinaemiás betegek vizsgálata során. A HDL-C számos antiatherogen tulajdonsággal rendelkezik, így pl. biztosítja a koleszterin transportját a peripheriáról a májba. Vizsgálatunk eredménye, mely szerint a HDL-C a többi tényezőtől függetlenül negatívan korrelál az IMT-vel, azaz kedvező hatással bír a korai atherosclerosisban is, tovább hangsúlyozza a HDL-C-szint növelését célzó terápiák fontosságát.

Azon eredményünk, mely szerint a szérum ADMA koncentráció nem tért el szignifikánsan az atheroscleroticus és a nem atheroscleroticus csoportban, több más vizsgálat eredményeivel összevág, melyek coronaria betegek bevonásával készültek (Wang és mtsai 2006, Tagawa és mtsai 2004).

A jelen vizsgálat fő hiányossága, hogy nem tudtunk közvetlen bizonyítékkal szolgálni arra vonatkozóan, hogy az iNOS indukálva volt, mivel etikai és biztonságossági okokból kifolyólag az atheroscleroticus laesiokból nem vettünk mintát. Emiatt csak feltételezni tudjuk (laboratóriumi paraméterek és irodalmi adatok alapján), hogy az enzim indukálva volt.

Összegezve: *eredményeink alapján felvetjük, hogy az ADMA protektív (és nem károsító) hatást fejt ki az iNOS indukációjával járó állapotokban, amennyiben az ADMA koncentrációja abban a tartományban mozog, amelyben az eNOS gátlása még nem számottevő. Ennek értelmében az ADMA-szint csökkentését célzó terápiás beavatkozásoknál az ADMA célértéket 1 $\mu\text{mol/L}$ körül lenne érdemes meghatározni. A jelen vizsgálat eredményei vélhetőleg akkor kapnak nagyobb hangsúlyt, amikor új, specifikusan az ADMA szintjét csökkentő terápiás stratégiák látnak napvilágot.*

7. Összefoglalás

Az atherosclerosis kialakulása és az endotheliális NOS által termelt NO közti kapcsolat jól ismert, hiszen az endothel dysfunctiót (azaz az endothel dependens NO felszabadulás károsodását) már régóta az atherosclerosis előhírnökének tekintik. Emellett a közelmúltban egy új inzulin szenzitizáló mechanizmust is leírtak, amely a neuronális NOS által termelt NO mediációjával fokozza a vázizom inzulinérzékenységét. Ismeretes a NOS-nak egy harmadik izoformája is, az indukálható NOS, melynek működése során igen reaktív és atherogen peroxinitritek keletkeznek. A három NOS izoforma eltérő funkciói és sajátosságai egy újonnan azonosított endogén NOS gátló, az ADMA kapcsán kerültek vizsgálataink középpontjába. Az ADMA különböző kinetikával gátolja a három izoformát.

Kutatásaink során egyfelől megvizsgáltuk, hogy az ADMA – feltehetően az eNOS és az nNOS egyidejű gátlásával - hozzájárul-e az atherosclerosis és az inzulinrezisztencia szimultán kialakulásához. Másfelől elemeztük, hogy feltehetően indukált iNOS mellett kedvező hatással rendelkezik-e az ADMA azáltal, hogy ezt a (krónikus aktiváció esetén) káros hatású NOS izoformát gátolja a legerősebben.

Eredményeink szerint a SDMA illetve az ADMA/SDMA arány (amely az intracelluláris NOS enzim által hozzáférhető ADMA mennyiségének, úgy tűnik, jobb mutatója, mint a szérum ADMA-szint) pozitív korrelációt mutatott az inzulinrezisztencia jellemzésére használt HOMA indexszel az atheroscleroticus betegeknél, mely hatás a többszörös lineáris regressziós elemzés során a zavaró tényezőkre történt korrigálást követően is megmaradt.

Másfelől kimutattuk, hogy az ADMA szint negatívan korrelál az IMT-vel, a cerebro- és cardiovascularis betegségek súlyosságával, mely negatív korreláció a többszörös lineáris regressziót követően is szignifikáns maradt. Ez arra utal, hogy a normális koncentráció-tartomány felső részéhez közel eső szérum ADMA-szint az iNOS gátlása révén jótékony hatású atheroscleroticus betegekben.

Összegezve: *eredményeink az ADMA központi szerepét támasztják alá az inzulinrezisztencia és az atherosclerosis párhuzamos evolúciójában.*

8. Summary

The link between the evolution of atherosclerosis and endothelium derived NO synthesized by endothelial NOS (eNOS) is long acknowledged since endothelial dysfunction (that is the deterioration of endothelium dependent NO release) is viewed as the forerunner of atherosclerosis. Additional to this a novel insulin sensitizing mechanism was described that is also linked to NO dependent mechanisms e.g. the activation of nNOS and is able to enhance the insulin sensitivity of striated muscle. There exists yet a third isoform of NOS, the inducible isoform (iNOS) that yields the highly reactive peroxynitrite. The different effect of these three distinct isoforms of NOS came into the focus of our attention due to the identification of a novel endogenous nitric oxide synthase inhibitor the asymmetrical dimethylarginine (ADMA). ADMA inhibits the three isoforms with different kinetics.

Within the frame of our research on one hand we investigated if the simultaneous inhibition of eNOS and nNOS is able to contribute to the evolution of atherosclerosis and insulin resistance. On the other hand we assessed if the inhibition of iNOS is able to confer beneficial effect in a condition when the enzyme is probably induced e.g. in early-onset atherosclerosis

We found that SDMA or rather the proportion of ADMA/SDMA (a more appropriate indication of the intracellular ADMA level) showed positive correlation with the HOMA index used for the characterization of insulin resistance, an effect that remained significant even after correction for confounders if only atherosclerotic patients were included in the analysis.

On the other hand, we found that ADMA level negatively correlated with intima-media thickness a surrogate for cerebro- and cardiovascular diseases, and this negative correlation remained significant even after correction for confounders.

Summarizing: *our results we propose that ADMA assumes a central role in the simultaneous evolution of atherosclerosis and insulin resistance, furthermore we found that near-normal ADMA level is beneficial in atherosclerotic patients, probably by inhibiting peroxynitrite formation.*

9. Irodalom

1. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP *et al.* Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001; 88: 1201-1203
2. Agewall S, Fagerberg B, Attvall S *et al.* Carotid artery wall intima-media thickness is associated with insulin-mediated glucose disposal in men at high and low coronary risk. *Stroke* 1995; 26: 956-960
3. Arcaro G, Cretti A, Balzano S *et al.* Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation* 2002; 105: 576-582
4. Bokemark L, Wikstrand J, Attvall S *et al.* Insulin resistance and intima-media thickness in the carotid and femoral arteries of clinically healthy 58-year-old men. The Atherosclerosis and Insulin Resistance Study (AIR). *J Intern Med* 2001; 249: 59-67
5. Bonora E, Saggiani F, Targher G *et al.* Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 57-63
6. Bonora E, Formentini G, Calcaterra F *et al.* HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1135-1141
7. Bots ML. Carotid intima-media thickness as a surrogate marker for cardiovascular disease in intervention studies. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 2181-90
8. Böger RH, Bode-Börger SM, Kienke S *et al.* Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998; 136: 67-77
9. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM *et al.* Elevation of asymmetrical

dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clinical Science* 2001; 100: 161-167

10. Böger RH, Zoccali C. ADMA a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 23-28

11. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 824-833

12. Bray JM, Glatt B. Quantification of atheromatous stenosis in the extracranial internal carotid artery. *Cerebrovasc Dis* 1995; 5: 414-426

13. Carpenter JP, Lexa FJ, Davis JT. Determination of duplex Doppler ultrasound criteria appropriate to the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Stroke* 1996; 27: 695-699

14. Buttery LD, Springall DR, Chester AH *et al*. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75: 77-85

15. Cardounel AJ, Zweier JL. Endogenous methylarginines regulate neuronal nitric oxide synthase and prevent excitotoxic injury. *J Biol Chem* 2002; 277: 33995-34002

16. Chan NN, Chan JCN. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular disease in insulin resistance syndrome. *Diabetology* 2002; 45: 1609-1616

17. Chen LK, Lin MH, Chen ZJ *et al*. Metabolic characteristics and insulin resistance of impaired fasting glucose among the middle-aged and elderly Taiwanese. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 71: 170-176

18. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A *et al*. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997; 1: 65-73

19. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb*

Vasc Biol 2000; 20: 2032-2037

20. Cromheeke KM, Kockx MM, De Meyer GR *et al.* Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 744-754

21. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003; 108: 3042-3047

22. Elesber AA, Solomon H, Lennon RJ *et al.* Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated asymmetric dimethylarginine in patients with early atherosclerosis. *Eur Heart J* 2006; 27: 824-831

23. Fleck C, Janz A, Schweitzer F *et al.* Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int* 2001; Suppl 78: S14-18

24. Fleck C, Schweitzer F, Karge E *et al.* Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 2003; 336: 1-12

25. Fliser D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 71-79

26. Fujiwara S, Emoto M, Komatsu M *et al.* Arterial wall thickness is associated with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 246-252

27. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 2005; 36: 232-40

28. Görtler M, Widder B, Schuetz U. Quantifying medium- and high-grade carotid artery stenosis by ultrasound. *JEMU* 1996; 17: 235-239

29. Guarino MP, Adonso RA, Raimundo N *et al.* Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin sensitizing substance action. *Am J. Physiol.*

Gastrointest. Liver Physiol 2003; 284: G588-G594

30. Guarino MP, Correia NC, Lutt WW *et al.* Insulin sensitivity is mediated by the activation of the Ach/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G527-G532

31. Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 97(2A): 3A-11A

32. Howard G, Sharrett AR, Heiss G *et al.* Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *Stroke* 1993; 24: 1297-1304

33. Ianaro A, O'Donnell CA, Di Rosa M *et al.* A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. *Immunology* 1994; 82: 370-375.

34. Junyent M, Cofan M, Nunez I *et al.* Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1107-1113

35. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM *et al.* Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 170-176

36. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 186-202

37. Laakso M, Sarlund H, Salonen R *et al.* Asymptomatic atherosclerosis and insulin resistance. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1068-1076

38. Lutt WW, Macedo MP, Sadri P *et al.* Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G29-G36

39. Lutt WW, Macedo MP, Dadri P *et al.* Pharmaceutical reversal of insulin resistance. *Proc West Pharmacol Soc* 2004; 47: 30-32

40. Lutt WW. A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 9-17
41. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ *et al.* Vascular dysfunction in monkeys in diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 24-29
42. Lentz SR, Rodinov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 61-65
43. Lenzen H, Tsikas D, Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and the risk for coronary heart disease: the multicenter CARDIAC study. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62(Suppl 13): 45-49
44. Lin KY, Ito A, Asagami T *et al.* Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987-992
45. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M *et al.* Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 111-116
46. Maas R, Böger RH. Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 5-17
47. Magyar MT, Szikszai Z, Balla J *et al.* Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke* 2003; 34: 58-63
48. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M *et al.* Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolases. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533-1540
49. Mathiesen EB, Joakimsen O, Bonna KH. Prevalence and risk factors associated with carotid artery stenosis: the Tromsø Study. *Cerebrovasc Dis* 2001; 12: 44-51

50. McLaughlin T, Stuhlinger M, Lamendola C *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations are elevated in obese insulin-resistant women and fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1896-1900
51. McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976; 154: 179-184
52. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP *et al.* Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146
53. Molnár-Perl I, Vasanits A. Stability and characteristics of the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *J Chromatograph A* 1999; 835: 73-91
54. Mügge A, Hanefeld C, Böger RH *et al.* Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine and the risk of coronary heart disease: rationale and design of the multicenter CARDIAC study. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 29-32
55. Nanayakkara PW, Teerlink T, Stehouwer CD *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentration is independently associated with carotid intima-media thickness and plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) concentration in patients with mild-to-moderate renal failure. *Kidney Int* 2005; 68: 2230-2236
56. Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP *et al.* The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clinical Nutrition* 2003a; 22: 17-22
57. Nijveldt RJ, Teerlink T, van Guldener C *et al.* Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. *Nephrol Dial Transplant* 2003b; 18: 2542-2550
58. Nonaka S, Tsunoda M, Imai K *et al.* High-performance liquid chromatographic assay of NG-monomethyl-L-arginine, NG,NG-dimethyl-L-

arginine, and NG,NG'-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J Chromatograph A* 2005; 1066: 41-45

59. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H *et al.* Metabolism of NG,NG-and NG,N'G-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 1987; 252: 526-537

60. Pistrosch F, Herbrig K, Kindel B *et al.* Rosiglitazone improves glomerular hyperfiltration, renal endothelial dysfunction, and microalbuminuria of incipient diabetic nephropathy in patients. *Diabetes* 2005; 54: 2206-2211

61. Pórszász R, Légvári G, Németh J *et al.* The sensory nitrenergic nature of the hepatic insulin sensitizing substance mechanism in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol* 2002; 443: 211-212

62. Pórszász R, Légvári G, Pataki T *et al.* Hepatic insulin sensitizing substance: a novel 'sensocrine' mechanism to increase insulin sensitivity in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1171-1179

63. Rabasa-Lhoret R, Laville M. How to measure insulin sensitivity in clinical practice? *Diabetes Metab* 2001; 27: 201-208

64. Sadri P, Lutt WW. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; G101-G108

65. Siroen MP, van der Sijp JR, Teerlink T. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethylarginine. *Hepatology* 2005; 41: 559-565

66. Simmons WW, Closs EI, Cunningham JM *et al.* Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *J Biol Chem* 1996; 271: 11694-11702

67. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC *et al.* A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-881

68. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R *et al.* Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin

resistance. *J Clin Invest* 1996; 97: 2601-2610

69. Steinberg HO, Baron AD. Insulin-dependent diabetes mellitus and nitrovasodilatation. Important and complex interactions. *Circulation* 1997; 95: 560-561

70. Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW *et al.* Relationship between insulin resistance and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287: 1420-1426

71. Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE *et al.* Endothelial dysfunction induced by hyperhomocys(e)inemia, role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003; 108: 933-938

72. Suzuki M, Shinozaki K, Kanazawa A *et al.* Insulin resistance as an independent risk factor for carotid wall thickening. *Hypertension* 1996; 28: 593-598

73. Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K *et al.* Close association of endothelial dysfunction with insulin resistance and carotid wall thickening in hypertension. *Am J Hypertens* 2004; 17: 228-232

74. Symons JD, Mullick AE, Ensunsa JL *et al.* Hyperhomocysteinemia evoked by folate depletion: effects on coronary and carotid artery function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 772-780

75. Tagawa T, Urabe Y, Kimura Y *et al.* Long-term treatment with probucol improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Hypertens Res* 2004; 27: 311-318

76. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 33-40

77. Tyagi N, Collins K, Steed MM *et al.* Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol* 2005; 289: H2649-H2656

78. Ueda S, Kato S, Matsuoka H *et al.* Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2003; 92: 226-233

79. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001;158: 425-430
80. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT *et al.* Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-2128
81. Vallace P, Leone A, Calver A *et al.* Accumulation of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575
82. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-1495
83. Wang J, Sim AS, Wang XL *et al.* Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis* 2006; 184: 383-388
84. Wang PW, Liou CW, Wang ST. Relative impact of low-density lipoprotein-cholesterol concentration and insulin resistance on carotid wall thickening in nondiabetic, normotensive volunteers. *Metabolism* 2002; 51: 255-259
85. Watarai T, Yamasaki Y, Ikeda M *et al.* Insulin resistance contributes to carotid arterial wall thickness in patients with non-insulin-dependent-diabetes mellitus. *Endocrin J* 1999; 46: 629-638
86. Widder B, Reutern GM, Neuerburg-Heusler D. Morphologische und dopplersonographische Kriterien zur Bestimmung von Stenosierungsgraden an der A. carotis interna. *Ultraschall Med* 1986; 7: 70–75
87. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL *et al.* Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2479-2488
88. Wohlin M, Sundstorm J, Amlov J *et al.* Impaired insulin sensitivity is an independent predictor of common carotid intima-media thickness in a population sample of elderly men. *Atherosclerosis* 2003; 170: 181-185
89. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F *et al.* Plasma concentration of

asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113-2117

90. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R *et al.* Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 490-496

91. Zoccali C. Endothelial damage, asymmetric dimethylarginine and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Blood Purif* 2002; 20: 469-472

92. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end stage renal disease. *Lancet* 2005; 358: 2113-2117

10. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló teljes közlemények

1. **Zsuga J**, Török J, Magyar MT, Valikovics A, Gesztelyi R, Kéki S, Csiba L, Zsuga M, Bereczki D. Serum asymmetric dimethylarginine negatively correlates to intima-media thickness in early-onset atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23: 388-394 (IF: 2.319)

2. **Zsuga J**, Török J, Magyar MT, Valikovics A, Gesztelyi R, Lenkei Á, Csiba L, Kéki S, Zsuga M, Bereczki D. Dimethylarginines at the crossroad of insulin resistance and atherosclerosis. *Metabolism* 2007; 56: 394-399 (IF: 2.294)

3. **Zsuga J**, Gesztelyi R, Török J, Kéki S, Bereczki D. Asymmetric dimethylarginine: a molecule responsible for the coexistence of insulin resistance and atherosclerosis via nitric oxide inhibition. *Med Hypotheses* 2005; 65: 1091-1098 (IF: 0.92)

4. **Zsuga J**, Gesztelyi R, Bereczki D. Asymmetricus dimetilarginin: egy új rizikófaktor az atherosclerosis és inzulinrezisztencia kialakulásában. *Metabolizmus* 2005; 3: 160-163

Az értekezés témájához kapcsolódó, fel nem használt teljes közlemények

1. **Zsuga J**, Tory K, Jaszlits L, Bajza Á, Németh J, Peitl B, Szilvassy Z. Pre-clinical methods for the determination of insulin sensitivity. *J Biochem Bioph Meth* 2004; 61: 253-258 (IF: 1.302)

2. **Zsuga J**, Pórszász R, Gesztelyi R, Németh J, Szolcsányi J, Szilvássy Z, Paragh G, Kovács P. A hepatikus inzulin szenzitizáció mechanizmus szenzoros nitreg jellege éber nyulakon. *Metabolizmus* 2003; 1: 57-59

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és absztraktok

1. **Zsuga J**, Gesztelyi R, Fekete I, Mihálka L, Csiba L, Bereczki D. A prior transient ischemic attack is independently associated with decreased in-hospital case fatality in diabetic and non-diabetic acute stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21(Suppl 4): 88

2. **Zsuga J**, Magyar MT, Gesztelyi R, Lenkey Á, Valikovics A, Csiba L, Bereczki D. Insulinrezisztencia fiatalkori atherosclerosisban. *Agyérbetegségek* 2005; 11: 34

Az értekezés témájához nem kapcsolódó teljes közlemények

1. Karsai D, Gesztelyi R, **Zsuga J**, Jakab A, Szendrei L, Juhász B, Bak I, Szabó G, Lekli I, Vecsernyés M, Varga E., Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem Biophys* 2007; 47: 45-52 (**IF: 2.138**)

2. Karsai D, **Zsuga J**, Juhász B, Dér P, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á, Gesztelyi R. Effect of Nucleoside Transport Blockade on the Interstitial Adenosine Level Characterized by a Novel Method in Guinea Pig Atria. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: 103-109 (**IF: 1.313**)

3. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Juhász B, Dér P, Vecsernyés M, Szentmiklósi AJ. Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull Math Biol* 2004; 66: 1439-1453 (**IF: 1.485**)

4. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Hajdu P, Szabo JZs, Cseppento A, Szentmiklósi AJ. Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22: 501-513 (**IF: 0.794**)

5. Benkő I, Djazayeri K, Ábrahám C, **Zsuga J**, Szilvássy Z. Rosiglitazone-induced protection against myelotoxicity produced by 5-fluorouracil. *Eur J Pharmacol* 2003; 477: 179-182 (IF: 2.352)

6. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Bajza Á, Cseppentő Á, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ. Special sensitization pattern in adenosine-induced myocardial responses after thyroxine treatment. *J Pharmacol Sci* 2003; 91: 295-304 (IF: 1.419)

7. Körtvély Á, Szigeti G, Gesztelyi R, **Zsuga J**, Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, Kovács L, Jednákovits A, Szentmiklósi AJ, Nánási PP. Cardiovascular effects of BRX-005: comparison to bimoctamol. *Life Sci* 2000; 67:1783-1789 (IF: 1.808)

Az értekezés témájához nem kapcsolódó posztterek és absztraktok

1. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Jakab A, Lekli I, Juhász B, Szabó G, Tósaki Á. Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic action of A₁ adenosine receptor in hyperthyroid atrium. *J Mol Cell Cardiol* (abstract accepted)

2. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Grenszer M, Jakab A, Szabó G, Juhász B, Lekli I, Vecsernyés M, Tósaki Á. Az adenosin dezamináz pentostatin általi gátlása növeli az M₂ muszkarin receptorok ingerlésével kiváltható negatív inotróp választ tiroxinkezelt tengerimalacok bal pitvarán. MÉT LXXI. Vándorgyűlése, Pécs 2007 (elfogadott absztrakt)

3. Karsai D, **Zsuga J**, Pásztor F, Jakab A, Juhász B, Gesztelyi R, Szentmiklósi J, Tósaki Á. Az adenosin dezamináz gátlása által kiváltott intracelluláris adenosin felhalmozódás hatása az A₁ adenosin receptorok válaszkészségére hyperthyreoid tengerimalacok bal pitvarán. Kórházi Gyógyszerészek XV. Kongresszusa, Eger 2006, P11

4. Karsai D, **Zsuga J**, Pásztor F, Jakab A, Juhász B, Gesztelyi R, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. Az adenosin dezamináz gátlása által kiváltott intracelluláris adenosin felhalmozódás hatása az A₁ adenosin receptorok

válaszkészségére hyperthyreoid tengerimalacok bal pitvarán. MÉT LXX. Vándorgyűlése, Szeged 2006, p. 241

5. **Zsuga J**, Gesztelyi R, Juhász B, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. Dózis-hatás görbék felhasználása koncentráció-beclésre: a Langmuir-Hill egyenlet alkalmazhatóságának kiterjesztése. A Magyar Klinikai Farmakológusok VII. Továbbképző Kongresszusa, Debrecen 2005, p. 22

6. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Tósaki Á. Egy régi-új megközelítés az interszticiális adozin koncentrációjának beclésére tengerimalac bal pitvaron. A Magyar Klinikai Farmakológusok VII. Továbbképző Kongresszusa, Debrecen 2005, p. 22

7. **Zsuga J**, Gesztelyi R, Tósaki Á. Implementation of concentration-response curves for concentration estimation: the extension of the scope of the Langmuir–Hill equation. Semi-centennial conference of Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Budapest 2005, P-104

8. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Tósaki Á. An old-new approach for estimating the change in interstitial adenosine concentration in guinea pig atria. Semi-centennial conference of Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Budapest 2005, P-35

9. **Zsuga J**, Gesztelyi R, Karsai D, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. Implementation of concentration-response curves for concentration estimation: the extension of the scope of the Langmuir–Hill equation. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma, Budapest 2005, p. 79

10. Gesztelyi R, Karsai D, **Zsuga J**, Vecsernyés M, Tósaki Á. An old-new approach for estimating the change in interstitial adenosine concentration in guinea pig left atria. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma, Budapest 2005, p. 18

11. Gesztelyi R, Karsai D, **Zsuga J**, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. A nukleozid transzport gátlásának hatása az interszticiális adozin szintjére eu- és hipertiroid tengerimalac bal pitvaron. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság VI. Kongresszusa, Magyar Klinikai Farmakológusok VI. Továbbképző Kongresszusa, Debrecen 2004

12. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Cseppentő Á, Vecsernyés M, Szentmiklósi AJ. Az A₁ típusú adenosin receptor-válasz változásának felhasználása adenosin analógok interstitiális koncentrációjának meghatározására. MÉT LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen 2004
13. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Cseppentő Á, Bajza Á, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ. Foszfoprotein foszfatáz gátlók hatása az adenosin kardiodepresszív hatására kísérletes hipertireózisban. MÉT LXVII. Vándorgyűlése, Pécs 2003, p. 68
14. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Bajza Á, Cseppentő Á, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ. Modified responsiveness of atrial myocardium to inhibitors of membrane purine transport and adenosine deaminase after chronic thyroxine treatment. Acta Physiol Hung 2002; 89(1-3): 171
15. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Bajza Á, Cseppentő Á, Varga A, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ. Extra- és intracelluláris adenosin receptorválaszok időfüggő módosulása tiroxin kezelés során tengerimalac bal pitvari myocardiumon. MÉT LXVI. Vándorgyűlése, Szeged 2001, p. 47
16. Gesztelyi R, **Zsuga J**. Thyroxin kezelés hatása a myocardiális A₁-, valamint a vasculáris A₁- és A_{2B} típusú adenosin receptorokon mediálódó válaszokra. DEOEC ÁOK Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója 2000; p. 64
17. Cseppentő Á, Ujfalusi A, **Zsuga J**, Gesztelyi R, Kovács P, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ. The effect of chronic thyroxine treatment on cardiovascular adenosine receptors. Fundam Clin Pharm 1999; 13(Suppl 1): PT54

11. Tárgyszavak

Magyar: ADMA, SDMA, atherosclerosis, inzulinrezisztencia, carotis, gyulladás, nitrogén-oxid szintetáz, vaszkuláris rizikófaktorok.

Angol: ADMA, SDMA, atherosclerosis, insulin resistance, carotid arteries, inflammation, nitric oxide synthase, vascular risk factors.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki elsőként témavezetőmnek, Dr. Bereczki Dániel egyetemi tanárnak (DEOEC Neurológiai Klinika) munkám irányításáért és szakmai támogatásáért.

Köszönettel tartozom Dr. Csiba László egyetemi tanárnak (DEOEC Neurológiai Klinika) szakmai tanácsaiért és munkám feltételeinek biztosításáért.

Köszönöm továbbá a DE TEK Alkalmazott Kémia Tanszék munkatársainak, Dr. Kéki Sándornak és Dr. Török Jánosnak, hogy laboratóriumi munkámat segítették.

A munka anyagi fedezetét Dr. Bereczki Dániel és Dr. Zsuga Miklós egyetemi tanárok, továbbá Dr. Kéki Sándor egyetemi docens és Dr. Magyar Tünde egyetemi adjunktus témátámogatásai biztosították: MU-00204/2001; ETT 173/2006; 178/2006; RET 0006/2004; DEOEC MEC 08/2005; OTKA K 62213; Bolyai János ösztöndíj.

13. Fűggelék