

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.

1. Rövidítések

a.	arteria
ADMA	aszimmetrikus dimetilarginin
Apo-A1	apolipoprotein A1
Apo-B	apolipoprotein B
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
CRP	C reaktív protein
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintetáz
HDL-C	magas denzitású lipoprotein
HISS	hepaticus inzulin szenzitizáló substantia
HOMA	Homeostasis Model Assessment of β cell function and insulin resistance
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintetáz
IC ₅₀	félhatásos inhibitoros koncentráció
IMT	intima-media vastagság (intima-media thickness)
KI	konfidencia intervallum
Koeff	regressziós koeficiens
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
Lp(a)	lipoprotein a
NOS	nitrogén-monoxid szintetáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintetáz
NO	nitrogén-monoxid
SDMA	szimmetrikus dimetilarginin
y ⁺ 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. Az endogén NO emellett összefüggésben áll az inzulinérzékenységgel is. 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.

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

szintjének megemelkedését írták le. 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. Kimutatták azt is, hogy ebben a betegcsoportban a plazma ADMA-szint 2 $\mu\text{mol/L}$ -es növekedése 37%-kal növeli a fatális és a nem fatális cardiovascularis események kialakulásának kockázatát, valamint azt, hogy mind a cardiovascularis, mind az ösztörtalitás magasabb plazma ADMA koncentrációval társul.

Ismertté vált az is, hogy az ADMA-szint és a vascularis intima-media vastagság (IMT) között szoros korreláció áll fenn, 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 ösztörtalitás viszonylatában.

Összegezve elmondhatjuk, hogy az ADMA feltehetően fontos diagnosztikus markerré válhat a cardiovascularis rizikó szempontjából, azonban további vizsgálatokra van szükség.

A metilargininek keletkezése

A metilált arginin-származékok - az ADMA, a szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) és az L-N-monometilarginin (L-NMMA) - a poszttranszlációs metiláláson átesett fehérjék proteolysis során keletkeznek a normál fehérje-turnover során. 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 termelődésére.

Az arginin-oldallánc nitrogén atomján az aszimmetrikus mono- és dimetilálást a protein-arginin-metiltransferáz-I. végzi. A protein-arginin-metiltransferáz-II aszimmetrikus mono- és szimmetrikus dimetilálást végez. Szubsztrátjaik elsősorban RNS kötő fehérjék, melyek metilációja minden sejtben végbemegy. A metilcsoport donora az S-adenozil-metionin, a metiláció melléktermékeként S-adenozil-homocisztein, majd homocisztein keletkezik. A szokásos 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. 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 és az L-NMMA gátolja, közvetve minden metilált arginin akadályozza az endotheliumban zajló NO szintézist az arginin sejtbe jutásának kompetitív gátlásával.

Az ADMA eliminációja

Az ADMA két úton eliminálódik a szervezetből. Egyfelől a plazmába került ADMA a vesetubulusokban excretálódik (ugyanott az y^+ transporteren keresztül az L-argininnel kompetícióban részben visszaszívódik), másfelől intracellulárisan a dimetilarginin dimetilaminohidroláz dimetilaminra és citrullinra bontja. A dimetilarginin dimetilaminohidroláz nagyfokú érzékenységet mutat az oxidatív

stresszel szemben, ami nagy valószínűséggel felelős az ADMA-szint hyperglycaemiában, hypercholesterinaemiában és hyperhomocysteinaemiában való megemelkedéséért. A szisztémás keringésben megjelenő ADMA metabolizmusában kiemelt szerepet játszik a máj, mind az γ^+ transporter, mind a dimetilarginin dimetilaminohidroláz nagymértékben expresszálódik hepatocytákban.

Az ADMA és a homocisztein kapcsolata

A hyperhomocysteinaemia kapcsolata az atherosclerosis már mintegy 30 éve felmerült. A plazma homocisztein-szintjének a referenciatartomány fölé emelkedése a myocardialis infarctus és a mortalitás relatív kockázatát háromszorosra növeli. Számos tanulmány igazolja továbbá, hogy hyperhomocysteinaemiában a fokozott áramlás kiváltotta endothelium-dependens vazodilatáció károsodik, azaz vélhetőleg az endothelialis NO termelés csökken. Mivel a metilargininek szintézise során ekvimolárisan homocisztein keletkezik, az ADMA és a homocisztein hatásai nem vizsgálhatók egymástól függetlenül.

A mentylargininek 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 ADMA IC_{50} értéke az eNOS-on 3,9 $\mu\text{mol/L}$ endothelialis sejt kultúrákban. Az ADMA neuronális koncentrációja az nNOS több mint 50%-os gátlását eredményezi, tehát az ADMA a nNOS működését is modulálja fiziológias körülmények között. Ugyanakkor már 1 $\mu\text{mol/L}$ ADMA képes az iNOS-t majdnem teljesen

gátolni, tehát már a normál ADMA koncentráció-tartomány (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 az iNOS-t csaknem teljesen gátolják. A három NOS izoforma eltérő, sokszor ellentétes hatásokat közvetít, ezzel magyarázható, hogy az eNOS gátlása atherosclerost, az nNOS-é inzulinrezisztenciát indukálhat, míg az iNOS gátlásának antiatherogén hatású. Vagyis, az ADMA, mint a NOS fő endogén gátlója, protektív és káros hatásokat egyaránt kifejthet.

Az ADMA direkt NOS inhibitor hatásán túl kimutatták, hogy gátolja az NO termelődését azáltal is, hogy csökkenti az arginin hozzáférését az y^+ transporterhez, mely az arginin sejtbe juttatásáért felelős. Noha a SDMA közvetlenül nem gátolja a NOS-t, csökkenti az NO szintézisét azáltal, hogy a SDMA is verseng az argininnel az y^+ transporteren. Másrészt viszont az ADMA celluláris felvételét is akadályozza, ami viszont protektív hatású. Bár néhány elemzés nem talált korrelációt a SDMA-szint és az ösztimortalitás, valamint a SDMA koncentráció és egyes cardiovascularis események között, a kimondottan a SDMA-ra fókuszáló vizsgálatok megállapították, hogy az emelkedett SDMA-szint növeli a cardiovascularis kockázatot. 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.

Atherosclerosis és inzulinrezisztencia

Korábbi kutatások eredményei alapján felmerült, hogy az inzulinérzékenység előfeltétele az endothelialis NO termelésének, ami alapvető meghatározója az intakt endothelfunkciónak. Az endothelialis dysfunctiot (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 betegekben is. Inzulinérzékenyítő szer, például a metformin és a roziglitason alkalmazását követően az inzulinrezisztencia és az endothelialis dysfunctio párhuzamos javulása szintén oksági kapcsolatot feltételez. Sőt, az emelkedett plazma ADMA-szint inzulinrezisztenciát és ezzel egyidejűleg endothel dysfunctiot okoz nem diabeteses egészséges önkéntesekben is.

Összegezve: korábbi megfigyelések alapján az endothel dysfunctio és az inzulinrezisztencia közti kapcsolat hátterében az ADMA eNOS gátló hatása állhat.

Célkitűzések

Inzulinrezisztencia létrejöttében szerepe lehet az ADMA felszaporodásának, amely gátolva az nNOS-t károsítja az inzulinérzékenységet. Másfelől, az eNOS gátlása atherogen faktor. Fontos azt is megjegyezni, hogy az inzulinrezisztencia által okozott metabolikus eltérések tovább emelik a szisztémás ADMA koncentrációt, tehát gyorsítják mind az inzulinrezisztencia, mind az atherosclerosis progresszióját. Kutatási hipotézisünkben tehát felvetettük, hogy az ADMA azáltal, hogy gátolja a NOS neuronális és endothelialis isoformáját, inzulinrezisztenciát és atherosclerosis eredményez, vagyis az ADMA olyan molekula, mely felelős a két állapot párhuzamos kialakulásáért.

Az iNOS gyulladásos állapotokban upregulálódva elhúzódnó NO felszabaduláshoz vezet és az NO-ból képződő peroxinitritek atherogen hatásukkal súlyosbítják az állapotot. Az iNOS ugyanakkor sokkal érzékenyebb az ADMA általi gátlásra, mint az nNOS és az eNOS.

A fentiekből kiindulva felvethető, hogy az ADMA normál vagy kevéssel előltti koncentrációja védő hatást fejthet 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. E megfontolásokból kifolyólag kutatásaink során megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e az ADMA protektív hatása az általunk elemzett populációban.

4. Anyagok és módszerek

Vizsgálatok korai carotis stenosisban és occlusióban

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

1999. szeptember és 2001. november között 12 ezer beteget vizsgáltak a DOTE/DEOEC Neurológiai Klinika Neurosonológiai Laboratóriumában. A vizsgálatba bevonható 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 napján részletes kérdőívet töltöttünk ki a cardiovascularis rizikófaktorokra vonatkozóan, 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 validált helyettesítő (surrogate) markerét. 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.

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 fagyasztottuk és -70 fokon tároltuk a laboratóriumi mérések elvégzéséig. A haematologiai vizsgálatokat a korábban leírtaknak megfelelően végeztük.

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 szilárd fázisú extrakciót megelőzően az SPE kolonnákat 0,1 ml borát puffer I-gyel (50 mmol/L borsav; pH 9,00±0,05) kondicionáltuk. Ezt

követően hozzáadtunk 250 μL szérumhoz belső standardként 50 μL 1000 $\mu\text{mol/L}$ -es homoarginin-t (HARG), majd 700 μl borát puffer I-gyel összekevertünk. Az így kapott oldatot keresztülfuttattuk az ILMVAK MPC 101 Z vákum pumpával és ILMVAK VCZ 324 kontroll dobozzal (750 mbar) felszerelt BAKER SPE 12 G minta preparáló manifoldon (12 kolonna, J.T. Baker). 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 koncentrált ammónia, víz és metanol (10/40/50/v/v/v) oldattal eluáltuk. Az alkalmazott vákuum 750 mbar volt. Az így kapott oldatot 60 °C-os vízfürdőn, nitrogén atmoszféra alatt, vákuum alkalmazásával szárazra pároltuk, ezután a száraz extraktumot 200 μl ionmentes vízben oldottuk.

Származékképzés

A 200 μl vízben oldott mintáinkat 63 μl 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.

Kromatográfiai körülmények

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. 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.

Az 1 ml-es minta a következőképpen készült: számított térfogatú standard oldatokhoz (1000 μM Arg, 100-100 μM ADMA ill. SDMA), 200 μl belső standard kiegészítve borát puffer I-gyel. Ehhez 315 μl származékképzőt adtunk.

A mintaelőkészítést a standard addíciós módszerrel végzett visszanyerés segítségével vizsgáltuk. Azonos szérum mintákhoz eltérő mennyiségben adtunk törzsoldatot és belső standardot.

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. A vizsgálatról minden esetben videofelvételt készítettünk. A stenosis mértékét 10%-os kategóriákban írtuk le a nemzetközileg elfogadott kritériumok alapján. 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, poststenotikusan csökkent 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-diaistoléban 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. A carotis bulbustól proximálisan 1 cm-es szakaszon milliméterenként 1-1 mérést végeztünk, azaz carotisonként 11, betegenként 22 értéket kaptunk. 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.

Az inzulinrezisztencia meghatározása

Az egyik általunk vizsgált fő kimeneti változó a HOMA index volt. A HOMA index az inzulinrezisztencia jellemzésének egyszerű és biztonságos 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 nagyobb HOMA index mellett és inzulinérzékenynek 4,4 alatti HOMA index esetén.

Statisztikai elemzés

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 a összehasonlítást, a gyakoriságokat pedig a Pearson χ^2 teszttel hasonlítottuk össze. Nem normális eloszlás esetén 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 jellemezhesük. Ennek érdekében először egyszerű lineáris regressziót végeztünk az inzulinrezisztencia lehetséges determinánsaival, 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 hypertoniát, a cerebrovascularis 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.

Az IMT és az ADMA szint kapcsolatának vizsgálata

Az IMT és az ADMA közti korrelációt Spearman féle korreláció-elemzés segítségével határoztuk meg. Ezen túl egyszerű lineáris regressziós elemzést is végeztünk az IMT lehetséges prediktoráival, 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, thrombocyta szám, szérum kreatinin-szint, szérum glükóz-szint, valamint thrombocyta 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 hipertonia 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 thrombocyta 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.

Az egyes változók közötti kapcsolatokat a regressziós koefficiensekkel (Koeff) és ezek 95%-os konfidencia intervallumával (KI) jellemeztük. Az elemzést Stata 8.2 (Stata Corporation) szoftverrel végeztük.

5. Eredmények

A dimetilarginin szint változása inzulinrezisztenciában és atherosclerosisban

Az inzulinérzékeny és inzulinrezisztens betegek demográfiai jellemzése és rizikóprofilja

A vizsgálati mintában az átlagéletkor 50,7 év volt , azonban az inzulinrezisztens betegek valamennyivel fiatalabbak voltak, mint az inzulinérzékeny csoport betegei (49,73 év, kontra 51,09 év). A férfiak és a nők megoszlásában nem mutatkozott különbség, nem volt különbség továbbá az arteria carotisok atherosclerosisában, a diabetes, a szívbetegség, a hypertonia, a dohányzás, a cardiovascularis megbetegedések és a thrombocyta gátlók alkalmazási gyakoriságát illetőleg sem. A cerebrovascularis 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.

Hasonlóképpen az arginin szint nem mutatott eltérést az inzulinérzékenység függvényében, míg 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 inzulin érzékenyekben ($0,37 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/L}$ 95% KI: 0,34, 0,39). Ennek megfelelően az arginin/ADMA illetve az ADMA/SDMA arány változatlan, illetve szignifikánsan alacsonyabb volt.

A szérum kreatinin szint továbbá nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést az inzulinérzékeny, és az inzulinrezisztens betegek között. A lipid homeostasis eltérései gyakoribbak voltak az inzulinrezisztens csoportban, ezt tükrözte az, hogy a triglycerid szint szignifikánsan magasabb, míg az Apo-A1 és a HDL-C szint szignifikánsan alacsonyabb volt az inzulinrezisztens egyéneknél.

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

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

A közel normál 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 rizikófaktora

A teljes vizsgálati mintában az átlagéletkor 50,7 év volt. Az életkor viszonylatában nem volt szignifikáns különbség az esetek és a kontrollok között. A nemi eloszlás nem különbözött, illetve nem volt eltérés a diabetes, és a szívbetegség prevenciájában, azonban a hipertónia, a dohányzás, a cardiovascularis megbetegedések, és a thrombocytá aggregatio gátlók használata gyakoribb volt az atheroscleroticus betegek körében, mint a kontrollokéban.

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

Az átlagos szérumszintű ADMA szint a teljes mintában $0,403 \pm 0,009 \mu\text{mol/L}$ (95% KI: 0,385, 0,421), az atheroscleroticus betegek körében $0,395 \pm 0,085 \mu\text{mol/L}$ (95% KI: 0,373, 0,417), a nem atheroscleroticus csoportban $0,419 \pm 0,088 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 0,386, 0,452) volt. Az IMT és az ADMA szint között negatív korrelációt találtunk a teljes adatbázis adatainak elemzését követően (Spearman korrelációs koefficiens: -0,300, $p=0,0041$) és az atheroscleroticus rétegben (Spearman korrelációs koefficiens: -0,323, $p=0,012$). Ezzel szemben nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció az atherosclerostól mentes csoportban.

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

Többszörös lineáris regressziót végeztünk az IMT és a szérum 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 vizsgálatainkat (β : -0,67, 95% KI: -1,16, -0,18; $p=0,008$, míg nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az atherosclerostól mentes betegek vizsgálatakor többszörös lineáris regressziós analízist végezve (β : -0,367, CI: -1,31, 0,576; $p=0,418$). Továbbá azt találtuk, hogy az ADMA mellett az atherosclerosis jelenléte is szignifikánsan hozzájárul az IMT növekedéséhez (β : 0,094, CI: 0,014, 0,17; $p=0,022$), míg a szérum HDL-C szintje védelmet biztosít az által, hogy az IMT is negatív korelációt mutat, azaz csökkenti (β : -0,081, KI: -0,156, - 0,006; $p=0,035$; β : - 0,11, KI: - 0,21, - 0,021; $p=0,018$) a teljes adatbázis, illetve az atheroscleroticus rétegben végezve a vizsgálatokat.

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.

Az adatok áttekintése során azt találtuk, hogy inzulinrezisztenciában az ADMA/SDMA arány növekedése a SDMA-szint csökkenéséből fakad, miközben az ADMA-szint gyakorlatilag változatlan. Ezzel egyezően az inzulinrezisztencia negatív korrelációt mutat a SDMA-val, de nincs szignifikáns kapcsolatban az ADMA-val.

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. 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. 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 γ^+ transzporterek 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 mindkettlen. 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 ADMA-szint és az inzulinrezisztencia közötti kapcsolat hiánya ellentmond egyes korábbi vizsgálatoknak, amelyekben 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. Ugyanakkor más munkacsoport is beszámolt arról, hogy nem találtak szignifikáns eltérést az ADMA-szintek között ép és károsodott endothelialis funkciójú coronariákkal rendelkező betegeket összehasonlításakor.

Kiindulva a sztereoizomer ADMA és SDMA versengéséből a sejtbe való bejutásért az γ^+ transzporterén keresztül, továbbá jelen eredményeinkből, 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 γ^+ 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.

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 betegeknél 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. 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 $\mu\text{mol/L}$ közti értéket vesz fel. A munkacsoportunk által vizsgált betegek vesefunkciója rendben volt, továbbá a vizsgált két csoportban (atheroscleroticus és ép carotisú) nem volt szignifikáns eltérés a szérum kreatinin-szintekben.

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 peroxinitritek keletkeznek.

A két izoforma gátlhatósága is eltérő: 3,9 $\mu\text{mol/L}$ ADMA az eNOS félmaksimalis gátlását hozza létre, ugyanakkor 1 $\mu\text{mol/L}$ ADMA az iNOS-t majdnem teljesen gátolja. Ebből kiindulva felvethető, hogy az ADMA a normál koncentráció-tartományban (0,35-1,0 $\mu\text{mol/L}$) illetve minimálisan e fölött (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.

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.

Abból kiindulva, hogy a gyulladás és a hyperhomocysteinaemia önmagában is elegendő az iNOS indukálásához, továbbá abból, hogy korábban leírták már az iNOS indukcióját az a. carotis interna atherosclerosisában, feltételezhető, hogy az iNOS a mi vizsgálatunk atheroscleroticus betegekben 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 (nem atheroscleroticus) egyénekben, , továbbá két másik vizsgálatról, melyek semmilyen jellegű kapcsolatot nem igazoltak e két paraméter között. 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 az IMT nő) magasabb felső értékig terjedt ki, és/vagy a betegekben nem zajlott aktív gyulladás illetve nem szenvedtek atherosclerosisban. 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.

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.

Összegezve: eredményeink alapján felvetjük, hogy az ADMA protektív (és nem károsító) hatást fejt ki az iNOS indukciójával járó gyulladásos 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 eNOS csökkent NO termelését már régóta az atherosclerosis előhírnökének tekintik. Emellett a közelmúltban körvonalazódott egy új inzulin szenzitizáló mechanizmus, amely nNOS által termelt NO mediációval fokozza a vázizom inzulinérzékenységét. A NOS harmadik izoformája az iNOS, melynek tartós aktivációja atherogen peroxinitritok keletkezéséhez vezet. Az ADMA eltérő kinetikával gátolja a három izoformát.

Eredményeink szerint a SDMA illetve az ADMA/SDMA arány (amely az interacelluláris NOS enzim által hozzáférhető ADMA mennyiségének, úgy tűnik, jobb mutatója, mint a szérum ADMA-szint) pozitív korrelációt mutatott az inzulinrezisztencia jellemzésére használt HOMA indexszel, 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 kiegészítő markerével, 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 kifejlődésében.

8. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló teljes közlemények

1. **Zsuga J**, Török J, Magyar MT, Valikovics A, Gesztelyi R, Keki 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, Lenkey 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 nitrogén 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. Inzulinrezisztencia 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(5): 1439-1453 (IF: 1.485)

4. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Hajdu P, Szabo JZs, Cseppento A, Szentmiklosi 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 bimoelomol. *Life Sci* 2000; 67:1783-1789 (IF: 1.808)

Az értekezés témájához nem kapcsolódó poszterek 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**, Grençzer M, Jakab A, Szabó G, Juhász B, Lekli I, Vecsernyés M, Tósaki Á. Az adenzin 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 adenzin dezamináz gátlása által kiváltott intracelluláris adenzin felhalmozódás hatása az A₁ adenzin 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 adenzin dezamináz gátlása által kiváltott intracelluláris adenzin felhalmozódás hatása az A₁ adenzin 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-beclsésre: 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 adenzin koncentrációjának beclsére 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 Tavasz 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 Tavasz Szimpóziuma, Budapest 2005, p. 18

11. Gesztelyi R, Karsai D, **Zsuga J**, Szentmiklósi AJ, Tósaki Á. A nukleozid transzport gátlásának hatása az interszticiális adenzin 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 A_1 típusú adenzin receptor-válasz változásának felhasználása adenzin analógok intersticiális 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 adenzin 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: 171

15. Gesztelyi R, **Zsuga J**, Bajza Á, Cseppentő Á, Varga A, Szabó JZ, Szentmiklósi AJ. Extra- és intracelluláris adenzin 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 myocardialis A_1 -, valamint a vascularis A_1 - és A_{2B} típusú adenzin 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