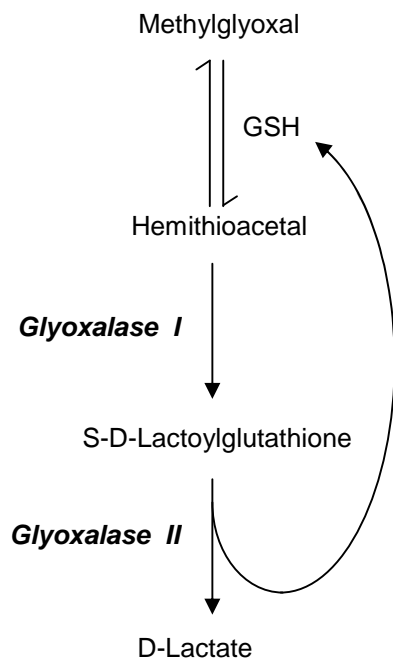


A reaktív karbonil vegyületek, mint glioxál, metilglioxál (MG), 3-deoxiglukóz, felhalmozódása urémiás betegekben a karbonil stressz. A karbonil stressz enzim gátlást, fehérje keresztkötések kialakulását (advanced glycation end-products, AGE), denaturációt, celluláris immunválaszt, membránkárosodást, mutagenezist, karcinogenezist eredményez. A karbonil vegyületek szerepet játszanak a végstádiumú, hemodializált (HD) vesebetegek szövődményeinek (felgyorsult ateroszklerózis, amiloidózis, malignitások) kialakulásában.

Az MG jelentőségét több megfigyelés is alátámasztja, így pl. az MG-származék lizin dimér (MOLD) szignifikánsan megemelkedik az urémiások vérében és a glioxal-származék lizin dimérrel (GOLD) együtt az AGE-k legnagyobb csoportját alkotja. Még kezdetben csak az MG-makromolekula kapcsolódásokat sikerült kimutatni, néhány tanulmány már az MG emelkedett szintjét is detektálta HD betegekben. Azonban az emelkedett MG szint oka urémiásokban nem ismert.

Az urémiás állapot és a HD oxidatív stresszt okoz, s felvetődött, hogy ez okozza a karbonil vegyületek fokozott képződését és csökkent lebontását. Az MG azonban döntően egy nem-oxidatív, spontán transzformáció útján képződik triózfoszfátokból. Másrészt az MG lebontásában kofaktor szerepet játszó redukált glutation (GSH) koncentrációja sem egyértelműen csökken HD betegekben, különböző vizsgálatok csökkent, normál, sőt emelkedett GSH koncentrációról számolnak be (1. ábra). A GSH kismértékű változásának szerepe azért is kétséges, mert GSH szintézis gátlásával elért ~80%-os GSH depléciónak befolyásolja az MGX felhalmozódást. Ismert esetközlés, ahol csökkent glioxaláz I aktivitás vezetett MG felhalmozódáshoz. Ez azonban egyedülálló jelenség, az urémiás betegekben a glioxaláz I aktivitás általában normális.



1. ábra

Fentiek alapján a jelen pályázatunk célja a HD kezelt urémiás betegek metilglioxál metabolizmusának vizsgálata volt.

- I. Első lépésként az MG meghatározásra alkalmas mérőmódszer beállításával foglalkoztunk. Vizsgálataink szerint a metilglioxál HPLC-vel történő meghatározása meglehetősen időigényes, és módosításokkal sem bizonyult elég specifikusnak és érzékenynek kis mennyiségű humán vérből történő analízishez. A MG tömegspektrométeren történő mérése az irodalmi adatok szerint érzékenyebb a fluoreszcens detektálásnál. Klinikánkon rendelkezésre áll egy MicroQuattro (Waters) tandem tömegspektrométer (MS/MS), ezért második lépésben egy tömegspektrometriás módszer beállításával próbálkoztunk. A korábban megjelent közleményekben gázkromatográfiás, vagy HPLC elválasztás után juttatták az anyagot a tömegspektrométerbe. A HPLC/MS mérése a HPLC meghatározáshoz hasonlóan instabilnak mutatkozott. Az o-feniléndiaminnal történő derivatizáció erősen eltért a belső standardként használt hexandion és MG között. Ez, s a minta többszöri tisztítása C18 SPE oszlopon nagy szórást mutató, nehezen

reprodukálható eredményeket adott. Ezért az eredeti módszert megváltoztatva áttértünk a diaminonaphthalennel történő derivatizációra és a tandem tömegspektrometriás detektálásra (HPLC- MS/MS). A metilgioxál-DAN (195) és hexándion-DAN (237) adduktumokat MRM módban mértük. E harmadikként beállított módszer ugyan jobb reprodukálhatóságot mutatott a korábbiakhoz képest, de érzékenysége alacsonynak bizonyult a céltartományhoz képest, továbbá időigényesnek volt a HPLC elválasztás miatt. Így az irodalomban leírt MG mérési módszerek bevezetésére tett próbálkozás után, azok bonyolult, hosszadalmas, alacsony érzékenyséű és nehezen reprodukálható volta miatt, kidolgoztunk egy saját módszert. A mérést plazmából és vörösvértestből (vvt) 100 ul térfogatból, fehérjementesítés (trifluoroecetsav) és derivatizálás (paraphenylendiamin), valamint kloroformos extrakció után közvetlenül az MS/MS készülékbe történő injektálással multiple reaction monitoring módban végezzük. A módszer újdonsága, hogy a tandem tömegspektrométer alkalmazásával ki tudtuk iktatni a HPLC-s vagy gázkromatográfiás elválasztást, így a mérési idő kevesebb, mint 1/10-re esett. A módszer érzékeny (min cc. 0,05 nM), specifikus, a mérési tartományban a válaszgörbe lineáris (0,05-100 nM), jól reprodukálható (interassay variation: 6-8%).

A megfelelő módszer kidolgozása nagyon sok időt igényelt, s csak a pályázat 3. évében valósult meg. Ezzel a tervezett vizsgálatok egy részét nem tudtuk elvégezni (MG szintek – szövődmények összefüggése). Úgy gondoljuk, hogy a módszer kidolgozására fordított idő mégsem veszett el. Eddig minimális számban jelentek meg MG szinteket vizsgáló közlemények az irodalomban, épp a meghatározás nehézségei miatt. Így a jelenleg rendelkezésünkre álló módszerrel számos területen lesz lehetőségünk új eredményeket elérni

- II. A módszer beállítása után megmértük a HD betegek vvt-ben és plazmájában az MG koncentrációt, mely mindkét kompartmentben szignifikánsan ($p < 0,001$, ill. $p < 0,001$) magasabbnak bizonyult a kontroll csoportéhoz képest. Dialízis hatására az MG szint kb. 35%-kal lecsökken ($p < 0,001$).

- III. Az MG módszer beállításával párhuzamosan végeztük a vvt glioxaláz aktivitás méréseket. A glioxaláz I aktivitásokban nem találtunk eltérést a HD és kontroll csoport között, azonban a glioxaláz II aktivitás szignifikánsan ($p < 0.005$) magasabb volt a HD betegekben.
- IV. A teljes vér GSH szintben nem találtunk szignifikáns különbséget a beteg és kontroll csoport között.
- V. A vvt D-laktát koncentráció nem különbözött a kontroll és beteg csoport között. A vvt -k mellett plazma D-laktát mérések is történtek. A módszer a D-laktát dehidrogenáz hatására termelődő NADH mennyiségét méri fluoreszcens detektálással. Még vvt-ben és a kontroll plazmákban a metabolit pontosan és jól reprodukálhatóan mérhető, a dializált betegek plazmájában vagy nagyon alacsony, vagy az esetek felében „negatív” szinteket mértünk. Korábbi vizsgálatainkkal együtt eddig kb. 70 normál plazmát mértünk, de hasonló jelenséget nem észleltünk. Egy újabb mérési módszer bevezetésével, melyben a reakció elegyet - egy korábbi közlés alapján - Na-glutamáttal és glutamát piruvát transzaminázzal egészítettük ki, mérhetővé vált a HD betegek plazmájának D-laktát szintje. Eredményeink szerint a plazma D-laktát koncentrációja a HD betegekben szignifikánsan ($p < 0.05$) alacsonyabb volt a kontrolléhoz képest. Ez az eredmény meglepő volt az emelkedett MG szint és glioxaláz II aktivitás tükrében, ezért a probléma tisztázására *in vitro* vizsgálatokat is végeztünk.
- VI. *In vitro* normoglikémiás körülmények között inkubálva a vvt-eket, a HD betegekből származó sejt szuszpenziók szignifikánsan magasabb MG ($p < 0.001$) és D-laktát ($p < 0.002$) szintet mutattak. A hiperglikémia kb. 8-10-szeresére fokozta a kontroll és HD vvt szuszpenziók MG és D-laktát tartalmát, de az emelkedés a HD inkubátumokban volt magasabb.
- VII. A MDA a dializált betegek vvt-ben emelkedett ($p = 0,006$). Azonban a glioxaláz rendszer aktivitása, ill. a D-laktát szint és az MDA, GSSG, GSH koncentrációk között nem találunk szoros összefüggést. Említésre méltó, hogy a betegek folyamatos E-vitamin terápiában részesülnek. Ezt etikai megfontolásból a vizsgálatok során sem függesztettük fel, s a compliance-t a vvt-k a normál

kontrollokhoz képest szignifikánsan ($p=0,0032$) emelkedett E vitamin szintje igazolta.

VIII. A HD betegek folyamatosan részesülnek erythropoetin kezelésben. Korábban munkacsoportunk igazolta, hogy az erythropoetin th. kezdetben oxidatív stresszt okoz a betegekben, majd ehhez az antioxidáns védekezőrendszerek adaptálódnak. Átmeneti kimosási periódus után 10 héten keresztül követtük a betegek glioxaláz rendszerének változását. Ebben a vizsgálatban a D-laktát szint a kezdeti alacsony értékről (4,38 uM) kb. 2,5-szeresére emelkedett (10,55 uM), majd egy alacsonyabb 1,5-2-szeres szinten (6,62-8,85 uM) ingadozott. A változások nem bizonyultak szignifikánsnak.

IX. Az autofluoreszcenciát mutató plazma AGE szintet direkt fluoreszcens spektroszkópiával vizsgálatuk. A dialízis hatására jelentős csökkenést találtunk ($p<0,001$). Ezeket a méréseket a MG meghatározással párhuzamosan kívánjuk folytatni.

Vizsgálati eredményeinkről közlemény készült, melynek megváltoztatott formája (revised version) ismételen be lett nyújtva a Nephrology Dialysis Transplantation címzetű folyóíráthoz. (Eszter Karg, Ferenc Papp, Noemi Tassi, Tamás Janáky, Gyula Wittmann, and Sándor Túri: Enhanced methylglyoxal formation in the erythrocytes of hemodialyzed patients). A közleményben megbeszélt eredmények röviden összefoglalva a következők:

A HD betegek vvt-ben fokozott az MG képződés, de a degradációs út is aktivált. A degradáció üteme azonban nem tart lépést az MG képződés mértékével, s a két metabolikus út egyensúlyának zavar vezet az MG felhalmozódáshoz. Úgy tűnik, hogy a fokozott MG képződés a glukóz metabolizmus zavarával van összefüggésben, mely fontos szerepet játszhat a betegek karbonil stresszének kialakulásában.