

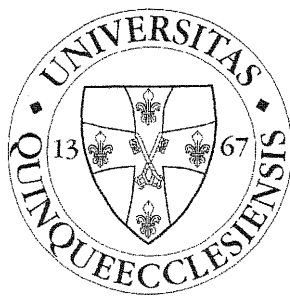
*A SZABAD GYÖKÖK PATOFIZIOLÓGIAI ÉS INTRACELLULÁRIS  
MEDIÁTOR SZEREPE A KARDIOVASZKULÁRIS RENDSZERBEN ÉS  
A VESÉBEN*

Doktori (PhD) - értekezés

Dr. Mazák István

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum



Pécs, 2007

*A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit*

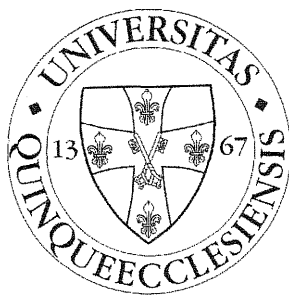
*Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István*

*A SZABAD GYÖKÖK PATOFIZIOLÓGIAI ÉS INTRACELLULÁRIS  
MEDIÁTOR SZEREPE A KARDIOVASZKULÁRIS RENDSZERBEN ÉS  
A VESÉBEN*

Doktori (PhD) - értekezés

Dr. Mazák István

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



Pécs, 2007

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István

## Tartalomjegyzék

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Rövidítések jegyzéke</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.</b> | <b>Összefoglaló</b>   | <b>7</b>  |
| <b>3.</b> | <b>Bevezetés</b>  | <b>8</b>  |
| 3.1.      | A szabad gyökök   | 9         |
| 3.1.1.    | A szabad gyökök felfedezése   | 9         |
| 3.1.2.    | A szabad gyökök keletkezése in vitro  | 9         |
| 3.1.3.    | A szabad gyökök keletkezése in vivo   | 10        |
| 3.1.4.    | A szabad gyökök fiziológiája  | 10        |
| 3.1.4.1.  | Szabad gyökök keletkezése a szervezetben  | 10        |
| 3.1.4.2.  | A NAD(P)H oxidáz felépítése   | 11        |
| 3.1.4.3.  | A NAD(P)H oxidáz működése   | 12        |
| 3.1.4.4.  | A NAD(P)H oxidáz aktiválása   | 12        |
| 3.1.4.5.  | A NAD(P)H oxidáz inaktiválása   | 13        |
| 3.1.5.    | A szabad gyökök hírvivő szerepe   | 13        |
| 3.1.6.    | A szervezet szabad gyököket semlegesítő rendszerei  | 14        |
| 3.1.6.1.  | A SOD   | 14        |
| 3.1.6.2.  | Kataláz   | 15        |
| 3.1.6.3.  | Glutation, glutation reduktáz, glutation peroxidáz  | 15        |
| 3.1.7.    | A szabad gyökök és a dohányzás  | 16        |
| 3.1.7.1.  | A dohányzás kardiovaszkuláris hatásában szerepet játszó szabad gyökös folyamatok  | 17        |
| 3.1.8.    | Az előrehaladott glikációs végtermékek és a szabad gyökök   | 17        |
| 3.1.8.1.  | Az előrehaladott glikációs végtermékek keletkezése és eliminációja  | 18        |
| 3.1.8.2.  | A glikációs termékek által aktivált hírvivő rendszerek  | 19        |
| 3.1.8.3.  | A vas anyagcsere, az oxidatív stressz és a nem enzimatis glikáció kapcsolata  | 19        |
| 3.2.      | Az intracelluláris kalcium  | 20        |
| 3.2.1.    | Az intracelluláris kalcium szint szabályozása   | 21        |
| 3.2.2.    | A kalcium szerepe a NOS aktiválásában   | 21        |
| 3.2.3.    | A nitrogén monoxid szerepe az intracelluláris kalcium szint csökkentésében  | 22        |
| 3.3.      | A renin - angiotenzin - aldosteron rendszer   | 22        |
| 3.3.1.    | Az angiotenzin II (Ang)   | 23        |
| 3.3.1.1.  | Az Ang receptorai és az azokon keresztül kifejtett hatások  | 23        |
| 3.3.2.    | Az aldosteron (Ald)   | 24        |
| 3.3.2.1.  | Az Ald szintézise és eliminációja   | 25        |
| 3.3.2.2.  | Az Ald nem-genomikus hatása   | 26        |
| 3.3.2.3.  | Az Ald genomikus hatása és a mineralokortikoid receptor   | 26        |
| 3.3.2.4.  | Az Ald hatása a kardiovaszkuláris rendszerre  | 28        |
| 3.4.      | A MAPK-k  | 29        |
| 3.4.1.    | Az ERK 1/2  | 29        |
| 3.4.2.    | Az ERK 5  | 30        |
| 3.4.3.    | A JNK   | 30        |
| 3.4.4.    | A p38 kináz   | 31        |
| <b>4.</b> | <b>Célkitűzések</b>   | <b>33</b> |
| <b>5.</b> | <b>Módszerek és eredmények</b>  | <b>34</b> |
| 5.1.      | Az MG és vas hatása a szabadgyök-képződésre és az ionizáltkalcium intracelluláris koncentrációjára izolált humán vvt-kben | 34        |
| 5.1.1.    | Módszerek   | 34        |
| 5.1.2.    | Eredmények  | 35        |
| 5.1.3.    | Összefoglalás   | 39        |
| 5.2.      | A vas hatására az MG és az arginin inkubációjából származó szabad gyökökre  | 39        |
| 5.2.1.    | Módszerek   | 39        |
| 5.2.2.    | Eredmények  | 40        |
| 5.2.3.    | Összefoglalás   | 42        |
| 5.3.      | Az MG hatására bekövetkező vasredukció  | 42        |
| 5.3.1.    | Módszerek   | 42        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.3.2.     | Eredmények  | 42         |
| 5.3.3.     | Összefoglalás   | 43         |
| 5.4.       | Az MG + arginin reakció termékének abszorpciós spektruma  | 43         |
| 5.4.1.     | Módszerek   | 44         |
| 5.4.2.     | Eredmények  | 44         |
| 5.4.3.     | Összefoglalás   | 45         |
| 5.5.       | A dohányfüst hatása a bradikinin-kiváltotta kalcium beáramlásra   | 46         |
| 5.5.1.     | Módszerek   | 46         |
| 5.5.2.     | Eredmények  | 47         |
| 5.5.3.     | Összefoglalás   | 52         |
| 5.6.       | Az Ald hatása simaizom sejtek ERK1/2 és JNK foszforiláltságára  | 52         |
| 5.6.1.     | Módszerek   | 53         |
| 5.6.2.     | Eredmények  | 53         |
| 5.6.3.     | Összefoglalás   | 55         |
| 5.7.       | Az Ald fokozza az Ang-kiváltotta ERK1/2 és JNK foszforillációt  | 55         |
| 5.7.1.     | Módszerek   | 56         |
| 5.7.2.     | Eredmények  | 56         |
| 5.7.3.     | Összefoglalás   | 59         |
| 5.8.       | Az MR-gátlók csökkentik az Ang-indukálta ERK 1/2 foszforilációt és a dTRG patkányokban kialakuló szervkárosodást                                | 59         |
| 5.8.1.     | Módszerek   | 60         |
| 5.8.2.     | Eredmények  | 62         |
| 5.8.3.     | Összefoglalás   | 64         |
| 5.9.       | A táplálkozás hatása a szérum és vizelet glikációs végtermék szintjére  | 64         |
| 5.9.1.     | Módszerek   | 64         |
| 5.9.2.     | Eredmények  | 68         |
| 5.9.3.     | Összefoglalás   | 70         |
| <b>6.</b>  | <b>Megbeszélés</b>  | <b>71</b>  |
| 6.1.       | Az MG indukálta arginin módosulást vas jelenlétében szabad gyökös folyamatok katalizálják   | 71         |
| 6.2.       | Az MG és az Fe <sup>2+</sup> hatása a vvt-k kalcium szintjére, oxidatív státuszára és a vas hatása a fenti folyamatokra                         | 72         |
| 6.3.       | A dohányfüst és a formaldehid hatása az endothel sejtek bradikinin kiváltotta kalcium szintváltozásra és a sejtek redox státuszának alakulására | 72         |
| 6.4.       | Az Ald hatása az Ang indukálta ERK 1/2 és JNK foszforilációra simaizom sejtekben  | 73         |
| 6.5.       | Az MR-gátlók hatása az Ang indukálta ERK 1/2 foszforilációra simaizom sejtekben és a dTGR patkányokban  | 76         |
| 6.6.       | A hőkezelt, magas fehérjetartalmú ételek AGE szintre és veseműködésre kifejtett hatásának vizsgálata egészséges önkénteseken                    | 78         |
| <b>7.</b>  | <b>Tézisek</b>  | <b>82</b>  |
| <b>8.</b>  | <b>A szerző értekezéssel kapcsolatos publikációi</b>  | <b>83</b>  |
| <b>9.</b>  | <b>Irodalomjegyzék</b>  | <b>87</b>  |
| <b>10.</b> | <b>Köszönetnyilvánítás</b>  | <b>100</b> |

**Rövidítések jegyzéke:**

|                                  |   |   |
|----------------------------------|---|---|
| ABPM                             | - | ambluáns vérnyomásmérő monitor  |
| ACE                              | - | angiotenzin konvertáló enzim  |
| ACTH                             | - | adrenokortikotropin   |
| ADP                              | - | adenozin difoszfát  |
| AGE                              | - | előrehaladott glikációs végtermékek                                     |
| AGE-ApoB                         | - | AGE-Apolipoprotein B  |
| Ald                              | - | aldoszteron   |
| Akt                              | - | fehérje kináz B   |
| Ang                              | - | angiotenzin II  |
| ANP                              | - | pitvari nátriuretikus peptid  |
| AP-1                             | - | aktivátor fehérje 1   |
| AT <sub>1</sub>                  | - | angiotenzin receptor 1  |
| AT <sub>2</sub>                  | - | angiotenzin receptor 2  |
| BMK-1                            | - | nagy molekulású kináz   |
| BSA                              | - | bovine serum albumine   |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | - | intracelluláris szabad ionizált kalcium                                 |
| cADPR                            | - | ciklikus adenzin difoszfát ribóz  |
| cAMP                             | - | ciklikus adenzin monofoszfát  |
| cGMP                             | - | ciklikus guanozin monofoszfát   |
| CHO                              | - | kínai hőrsög ovárium  |
| CM                               | - | kalmodulin  |
| CML                              | - | N <sup>ε</sup> -karboximetil-lizin                                      |
| COOH                             | - | karboxil csoport  |
| CRP                              | - | C reaktív fehérje   |
| CV                               | - | kardiovaszkuláris   |
| CYP11B2                          | - | aldoszteron szintáz   |
| CyP40                            | - | cyclophilin 40  |
| DCF-DA                           | - | dichlorofluorescein-diacetát  |
| DCF                              | - | dichlorofluorescein   |
| DMSO                             | - | dimetilsulfoxid   |
| DNS                              | - | deoxiribonukelinsav   |
| DOCA                             | - | deoxycorticosterone acetate   |
| DP                               | - | dohányfüst puffer   |
| DUSP                             | - | kettős specificitású foszfataz  |
| EDTA                             | - | ethylendiamintetraecetsav   |
| EGF                              | - | epiteliális növekedési faktor   |
| EGFR                             | - | epiteliális növekedési faktor receptor                                  |
| ENaC                             | - | epiteliális Na <sup>+</sup> csatorna                                    |
| EPHESUS                          | - | epierenone post acute myocardial infarction efficacy and survival study |
| ER                               | - | endoplazmatikus retikulum   |
| ERK 1/2                          | - | extracellulárisan szabályozott kináz ½                                  |
| ESR                              | - | elektronspin rezonancia   |
| FCS                              | - | fetal calf serum  |
| Fe <sup>2+</sup>                 | - | ferro ion   |
| Fe <sup>3+</sup>                 | - | ferri ion   |
| FGF                              | - | fibroblaszt növekedési faktor   |
| FKBP                             | - | FK506-kötő fehérje  |
| Fura-2-AM                        | - | fura-2-acetoximetilészter   |
| GDP                              | - | guanozin difoszfát  |
| GFR                              | - | glomerulus filtrációs ráta  |
| GILZ                             | - | glukokortikoid indukálta leuzin zipper                                  |
| Gly                              | - | glycin  |
| GR                               | - | glukokortikoid receptor   |
| GSH                              | - | redukált glutation  |
| GSH-Px                           | - | glutation peroxidáz   |
| GSSG                             | - | oxidált glutation   |
| GTP                              | - | guanozin trifoszfát   |
| HDL                              | - | nagy denzitású lipoprotein  |
| HPLC                             | - | nagy felbontású folyadék kromatográfia                                  |
| Hsp                              | - | hő sokk fehérje   |
| OH <sup>•</sup>                  | - | hidroxil szabad gyök  |
| OH                               | - | hidroxil csoport  |

|                               |   |   |
|-------------------------------|---|---|
| H <sup>+</sup>                | - | hidrogén                                      |
| HB-EGF                        | - | heparin kötő EGF szerű növekedési faktor      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | - | hidrogén peroxid                              |
| IGF-1                         | - | inzulin szerű növekedési faktor-1             |
| IL                            | - | interleukin                                   |
| Ile                           | - | izoleucin                                     |
| INF-γ                         | - | interferon-γ                                  |
| IP-3                          | - | inozitol trifoszfát                           |
| JAK                           | - | Janus kináz                                   |
| JAK2                          | - | Janus kináz 2                                 |
| JNK                           | - | cJUN anion terminális kináz                   |
| LDL                           | - | alacsony denzitású lipoprotein                |
| MAPK                          | - | mitogén aktivált protein kináz                |
| MCP-1                         | - | monocita kemotaktikus fehérje 1               |
| MEF2C                         | - | miocita növekedési faktor 2C                  |
| MG                            | - | metilglioxál                                  |
| MKK                           | - | MAP kináz kináz                               |
| MKKK                          | - | MAP kináz kináz kináz                         |
| MMP                           | - | mátrix metalloproteináz                       |
| MR                            | - | mineralokortikoid receptor                    |
| MRF                           | - | miogén szabályozó faktor 2                    |
| mRNS                          | - | messenger ribonukleinsav                      |
| NADH                          | - | nikotinamid adenin dinkleotid                 |
| NADPH                         | - | nikotinamid adenin dinukleotid foszfát        |
| NE                            | - | nemzetközi egység                             |
| NF-κB                         | - | nukleáris faktor kappa B                      |
| NO                            | - | nitrogén monoxid                              |
| NO <sub>2</sub>               | - | nitrát  |
| NOS                           | - | nitrogén monoxid szintáz                      |
| cNOS                          | - | konstitutív nitrogén monoxid szintáz          |
| eNOS                          | - | endoteliális nitrogén monoxid szintáz         |
| iNOS                          | - | indukálható nitrogén monoxid szintáz          |
| nNOS                          | - | neuronalis nitrogén monoxid szintáz           |
| O <sub>2</sub> <sup>•</sup>   | - | szuperoxid szabad gyök                        |
| Od                            | - | optikai denzitás                              |
| OPA                           | - | orto-phthalaldehid                            |
| PAK                           | - | p21 aktivált kináz                            |
| PBS                           | - | foszfáttal pufferolt só-oldat                 |
| PCR                           | - | polimeráz láncreakció                         |
| PDGF                          | - | trombocita eredetű növekedési faktor          |
| PDGFR                         | - | trombocita eredetű növekedési faktor receptor |
| PI-3 kináz                    | - | foszfátidil inozitol 3 kináz                  |
| PKA                           | - | protein kináz A                               |
| PKC                           | - | protein kináz C                               |
| PLC                           | - | foszfolipáz C                                 |
| PLD                           | - | foszfolipáz D                                 |
| PMSF                          | - | phenylmethylsulphonylfluoride                 |
| Pro                           | - | prolin  |
| PTP                           | - | fehérje tirozin foszfatáz                     |
| p38                           | - | p38 kináz                                     |
| RAAS                          | - | renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer        |
| RAGE                          | - | AGE receptor                                  |
| RALES                         | - | randomized aldactone evaluation study         |
| RAS                           | - | renin-angiotenzin rendszer                    |
| r.e.                          | - | relatív egység                                |
| RIPA                          | - | „radio-immunoprecipitation assay”             |
| R <sup>•</sup>                | - | alkén   |
| RO <sup>•</sup>               | - | alkén oxid                                    |
| ROO <sup>•</sup>              | - | alkén peroxid                                 |
| -S <sup>-</sup>               | - | tiolát anion                                  |
| SD                            | - | Sprague Dewley                                |
| SDS                           | - | nátrium dodecil szulfát                       |
| SEM                           | - | az átlag standar hibája                       |
| Ser                           | - | szerin  |

|                 |   |   |
|-----------------|---|---|
| SERCA           | - | sarco- vagy endoplazmatikus-retikulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz          |
| Sgk 1           | - | szérum és glükokortikoid szabályozott kináz                             |
| SH              | - | szulfhidril csoport   |
| -SOH            | - | szulfonsav  |
| SOD             | - | szuperoxid dizmutáz   |
| Spi             | - | spironolactone  |
| STAT            | - | stressz aktiválta tirozin kináz   |
| StAR            | - | szteroid akut szabályozó fehérje  |
| TG              | - | triglicerid   |
| TGF- $\beta$    | - | transforming növekedési faktor béta                                     |
| Thr             | - | threonin  |
| dTGR            | - | humán renin és humán angiotenzinogén génre kettős transzgenikus patkány |
| TNF- $\alpha$   | - | tumor nekrozis faktor alfa  |
| TRP             | - | transient receptor potential  |
| Tyr             | - | tyrozin   |
| RAS             | - | renin - angiotenzin – aldoszteron                                       |
| UV              | - | ultraviola  |
| VEGF            | - | ér endothel növekedési faktor   |
| vvt             | - | vörösvértest  |
| 11 $\beta$ HSD2 | - | 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2                              |

## 1. Összefoglalás

A modern életmód terjedésével, az élvezeti szerek egyre szélesebb körű és nagyobb mennyiségben történő fogyasztásával növekszik a civilizációs betegségek gyakorisága. Ezért a mai kutatások jelentős része foglalkozik a fenti betegségek pathogenezisével.

Kísérleteinkben, molekuláris rendszerekben vizsgáltuk cukorbetegekben, a nagyobb mennyiségben előforduló metilglioxál (MG) és vas interakcióját, ahol a vas redukcióját tudtuk kimutatni.

Az MG és az arginin interakciójának molekuláris vizsgálata során keletkező kation szabad gyök képződését a ferri ion fokozta – ami ferri ion kelátorral gátolható volt -, a ferro ion pedig csökkentette - ami ferro ion kelátorral volt megelőzhető. Az elektronspin rezonancia (ESR) vizsgálat során észlelt eltérő reakció további vizsgálatával mutattuk ki, hogy  $\text{Fe}^{2+}$  (ferro ion) hatására gyorsabban játszódik le a - spektrofotométerrel 490 nm-nél detektálható - termék képződése, mint  $\text{Fe}^{3+}$  (ferri ion) hatására.

In vitro rendszerben – vörösvértetekben –, az MG és  $\text{Fe}^{2+}$  növelte a szabad gyökök képződését valamint növelte az intracelluláris ionizált kalcium szintet. Az MG fenti hatásait szabadgyök-fogó vegyületek csökkentették, ami nem meglepő az MG intracelluláris szulfhidril csoport (SH) csökkenést okozó hatása ismeretében.

Endothel sejteken a dohányfüst, valamint annak formaldehid tartalma csökkentette a bradikinin kiváltotta ionizált intracelluláris kalciumszint emelkedést. E hatás redukált glutationnal kivédhető volt. A dohányfüst a fentiekkel összhangban csökkentette a sejtek thiol tartalmát, ami oxidatív stressz jelenlétére utal.

Mineralokortikoid-receptor-antagonistákkal in vitro sikerült csökkenteni az aldosteron (Ald) mitogén aktivált protein kináz (MAPK) rendszerre és szabadgyök-képződésre kifejtett hatását. A fentiek kapcsán válik világosabbá az eplerenon állatkísérletben talált kedvező hatása a szívelégtelenségre, a nephrosclerosisra és a proteinuriára, kihangsúlyozva a mineralokortikoid receptor antagonistá hatását a szöveti extracellulárisan szabályozott kináz 1/2 (ERK1/2) foszforilációra.

Humán vizsgálatban a mai civilizációs szokásokat vizsgálva az albuminuria növekedését találtuk hőkezelt, fehérjében gazdag ételek fogyasztásakor, és párhuzamosan nőtt a szérumban található glikációs termékek szintje is. Az évezredekkel korábban meglévő táplálkozási szokásokat tükröző, hőkezeletlen, növényi eredetű tápanyagban gazdag, kevesebb fehérjét tartalmazó étkezés kapcsán a szérum és vizelet glikációs



paraméterek csökkenése volt megfigyelhető.

### 3. BEVEZETÉS

Hazánk felnőtt lakosságának születéskor várható élettartama rövidebb, mint a világ fejlettebb országaiban. Ehhez számos tényező közül nagymértékben hozzájárulnak a napjaink morbiditási és mortalitási statisztikáit vezető kardiovaszkuláris (CV) betegségek. A CV rendszerre számos exogén és endogén károsító tényező fejt ki hatását, többek között atheroszklerózishoz, hipertóniához és cukorbetegséghez vezetve - részben az endothel és a simaizom sejtek károsodásán keresztül. A hipertónia nem csak a CV rendszer károsodása következtében alakulhat ki, hanem létrejöhet a vesében meglévő szabályozó rendszerek működésének zavara miatt is. A cukorbetegség kapcsán a CV prevenció fejlődésével egyre inkább előtérbe kerül a vese károsodása. Ezért érthető módon a kutatásokban a CV rendszer elemei mellett egyre fontosabb helyet foglal el a vesét érintő károsító folyamatok vizsgálata.

Az eddigi vizsgálatok egyre részletesebben tárták fel azon tényezőket, amelyek szerepet játszanak a CV betegségek létrejöttében. A vérnyomás egyik legfontosabb szabályozó eleme a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer. Kísérletek tucatjai mutattak rá a renin-angiotenzin rendszer (RAS) károsító hatására, fokozott működése esetén. Jól szemlélteti a fentieket egy olyan kísérletesen kialakított modell, mint a kettős transzgenikus patkány (dTGR), amely a veleszületett renin és az angiotenzinogen génen kívül hordozza a humán renin és angiotenzinogen gént is.<sup>1</sup> Ezen patkányokban megnőtt az artériák media vastagsága a simaizom sejtek növekedése következtében, vérnyomásuk mérsékelten emelkedett és glomeruloszklerózis fejlődött ki bennük. Az állatok a 7-10. hét folyamán pusztultak el végstádiumú vese- illetve szívkárosodás következtében. Bal kamra hipertrófia mellett a szívizomban fibrózist és nekrozist találtak, míg a vese szövettani vizsgálata hemolitikus urémiás szindrómának megfelelő eltérést mutatott.<sup>2</sup> Emellett endothelialis dysfunkciót találtak, ami antioxidánsokkal jelentősen mérsékelhető volt, utalva a fokozott szabad gyök képződés szerepére.<sup>3</sup> Endothelialis dysfunkció számos CV rizikófaktor, pl. hiperlipidémia, dohányzás, hipertónia, cukorbetegség fennállásakor kimutatható. Az endothelialis dysfunkció többek között csökkent nitrogén monoxid termeléssel, az angiotenzin konvertáló enzim fokozott működésével, fokozott angiotenzin II (Ang) képződéssel, emelkedett intracelluláris kalciumszinttel jár. A fenti elváltozások szinte

mindegyike megtalálható cukorbetegéknél is.

A káros környezeti tényezők - dohányzás, étkezési szokások, testmozgás hiánya - hatása viszonylag könnyedén csökkenthető életmód-változtatással. A napjainkban alkalmazott konyhaitechnikák során olyan anyagok (karcinogén anyagok, előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) stb.) keletkeznek, melyek fogyasztása a szervezetet károsíthatja. A rendszer összetett voltára enged következtetni, hogy pl. a szervezetet érő környezeti hatások elősegíthetik azon öröklött genetikai hajlam megjelenítését, melyek az addig egyensúlyi helyzetben levő rendszer felborulásához vezetnek. Másrészt a meglévő, pl. vérnyomást szabályozó renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer fokozott működését okozhatja egy-egy környezeti ágens.<sup>4</sup>

A rendszer összetettségét és szerteágazó volta miatt kutatásaimat igyekeztem egy vezérvonalra felfűzni. Az adatokat *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkből merítve részletezem.

Napjaink kiterjedt kutatásai ellenére a magas vérnyomásos esetek jelentős többsége még mindig esszenciálisnak eredetűnek tűnik, ami további kutatásokra ösztönöz. Ígéretesnek tűnik pl. az intracelluláris kalcium szerepének tisztázása a magas vérnyomá kialakulásában. Az endothel és a nitrogén monoxid - ciklikus guanozin monofoszfát (NO-cGMP) rendszer hibátlan működése fontos az egyensúlyi állapot fenntartásában. Nem hagyható figyelmen kívül a MAPK rendszer sem, amely fontos szerepet játszhat a hipertrófia, hiperplázia és az apoptózis kialakulásában. Szinte az összes folyamattal kapcsolatban igazolták a szabad gyökök másodlagos hírvivő szerepét.

### **3.1. A szabad gyökök**

#### **3.1.1. A szabad gyökök felfedezése**

A szabad gyökök környezetünkben mindenütt meglévő, nagy reakcióképességgel rendelkező molekulák. Létezésükről már Faraday 1847-es közleménye is tanúbizonyságot tesz.<sup>5</sup> Fenton 1894-ben közölte, hogy bizonyos fémek hidrogén peroxid ( $H_2O_2$ ) jelenlétében hidroxil szabad gyök ( $OH^\cdot$ ) keletkezését képesek katalizálni.<sup>6</sup> A szabad gyökök, élő szervezetekben való jelenlétét először az előző század közepén igazolták.<sup>7,8</sup>

#### **3.1.2. A szabad gyökök keletkezése *in vitro***

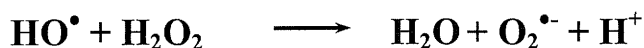
A szabad gyök olyan molekula, amelynek külső molekulaorbitálján párosítatlan spinű elektron van jelen. A párosítatlan elektron révén rendkívül reakcióképesek, így

féléletidejük nagyon rövid. A szabad gyökök közé tartozik a szuperoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), a  $OH^{\bullet}$ , a nitrogén-monoxid. Nem szabad gyök a  $H_2O_2$ , a peroxinitrit, valamint az erélyes oxidálószer.

Szabad gyökök mind az élő mind az élettelen világban lejátszódó folyamatok során keletkeznek. Ilyen reakció, pl. a  $H_2O_2$  bomlása vas jelenlétében:



amit leírója után Fenton reakciónak nevezünk.<sup>6</sup> A keletkezett  $OH^{\bullet}$  és  $H_2O_2$  reakciója során szuperoxid szabad gyök jön létre.



Az így létrejött  $O_2^{\bullet-}$ , hidrogén és víz jelenlétében hidroxil szabad gyökké alakul át.



A fenti láncreakciót nevezzük Haber-Weiss reakciónak, Haber és Weiss 1933 körüli leírása nyomán.<sup>9,10</sup>

### 3.1.3. A szabad gyökök keletkezése in vivo

Eleinte azt gondolták, hogy a szabad gyökök az élő szervezetekben kizárólag káros hatásúak.<sup>8</sup>

Később felismerésre került, hogy a szervezetben keletkező szabad gyökök számos fiziológiai folyamatban fontos szabályozó szereppel bírnak, pl. az immunvédekezés területén, valamint intracelluláris hírvivőként többek között a vaszkuláris rendszer szabályozása és a trombocita aggregáció területén.

### 3.1.4. A szabad gyökök fiziológiája

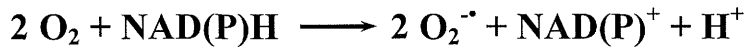
#### 3.1.4.1 Szabad gyökök keletkezése a szervezetben

A szabad gyökök keletkezésének szabályozott fiziológiás és patofiziológiás formája van. Jól körülhatárolt fiziológiai szerepük van az immunvédekezésben és számos sejtszintű folyamat szabályozásában. Az egyik legkorábban leírt ilyen folyamat a  $OH^{\bullet}$  által indukált cGMP termelés.<sup>11</sup>

A sejtekben a szabad gyökök képződése számos helye ismert. Ilyen enzimkomplex a nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (NADPH) oxidáz, valamint a hasonlóképpen nagy reaktivitással bíró xantin oxidáz és a glükóz oxidáz. Szabad gyököt képes létrehozni ezen

kívül a mitokondriális elektrontranszport lánc, a cytochrom P450 komplex, az arachidonsav metabolizálásában részt vevő lipoxigenáz valamint a ciklooxigenáz.<sup>12</sup>

Intracellulárisan a szabad gyökök keletkezésének egyik forrása a membránhoz kötött NAD(P)H oxidáz, amely egy flavin tartalmú enzim.<sup>13</sup> Felépítése részben eltér a más-más irányban differenciálódott mezodermális sejtvonalakban. Az oxidáz feladata szuperoxid szabad gyök képzésének katalizálása NAD(P)H felhasználásával:



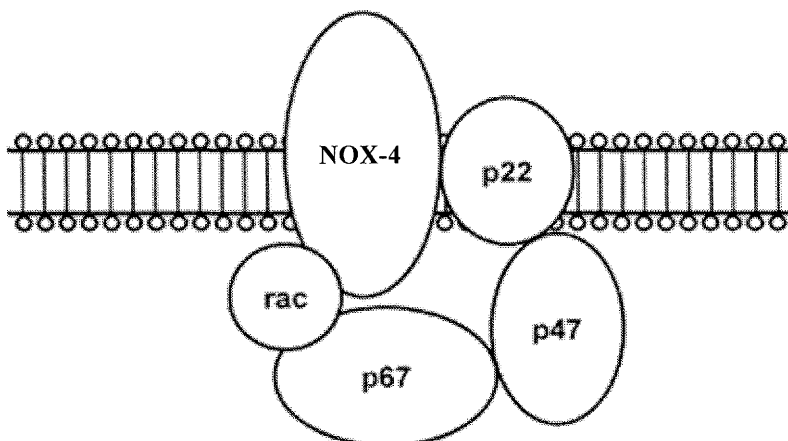
Az így keletkezett szuperoxid szabad gyök szervezetben betöltött szerepét alább részletezzük.

### 3.1.4.2. A NAD(P)H oxidáz felépítése

A legalaposabban a neutrofil granulociták NAD(P)H oxidáz rendszerét vizsgálták.<sup>13</sup> A vizsgálatok öt alegységét azonosították: p40, p47, p67, p22 és a gp91 alegységeket. Nyugalmi állapotban a p22 és gp91 komponensek – melyek cytochrom b<sub>558</sub> néven is ismertek – a membránban helyezkednek el, míg a p40, a p47 és a p67 alegységek a citoszolban találhatóak. Működésének szabályozásában fontos szerepe jut a Rac2 és a Rap1A nevű kis molekulású guanin nukleotid-kötő fehérjéknek. Endothel sejtekben és fibroblasztokban valamint mesangium sejtekben a fenti, neutrofil sejtekben lévő alegységeket szintén sikerült azonosítani.

Az erek simaizom sejtjeiben található NAD(P)H oxidáz felépítése – hasonlóan a mesangium sejtekhez – valamelyest eltér a fentiektől. A gp91phox csak a tüdő simaizom sejtjeiben található meg. A neutrofil sejtekben a szuperoxid gyök termeléséhez

nélkülözhetetlen  
gp67phox alegység  
messenger  
ribonukleinsavának  
(mRNS) jelenlétét  
sikerült igazolni  
simaizom sejtekben is.<sup>14</sup>



1. ábra A NAD(P)H oxidáz felépítése simaizom sejtekben

A fehérje nyugalmi állapotban levő simaizom sejtekből nem volt kimutatható, eltekintve néhány intimális simaizom sejtet. Az érfal simaizom sejtjeiben a NAD(P)H oxidáz felépítésében a nox1 vagy a nox4 alegység, a p22phox, valamint egy p47phox analóg és egy p67phox analóg alegység vesz részt.<sup>15</sup>

### 3.1.4.3. A NAD(P)H oxidáz működése

A simaizom sejtek szuperoxid termelése kb. 1-10%-át éri el a neutrofil sejtekben mérhetőnek.<sup>16</sup> Az endothel sejtekben tapasztalt alacsonyabb szuperoxid termelés oka a NAD(P)H oxidáz alegységek kisebb száma. Az endothel sejtek gp91phox és a 67phox alegységeinek mennyisége 1-3%-át éri a neutrofil granulocitákban található.<sup>17</sup> Az érfal simaizom sejtjeiben lévő NAD(P)H, eltérően a neutrofil sejtektől, kis mennyiségben, nyugalmi állapotban is termel szuperoxidot. Míg a lymphocytákból izolált membrán inaktív, amennyiben nem történik stimuláció – vélhetően a nagy mennyiségben termelt szuperoxid toxicitása miatt - addig a nem stimulált endothel sejtekből izolált membránban megfigyelhető egy folyamatos, alacsony oxidáz aktivitás.

A simaizom sejtekben a neutrofil sejtekben leírtakhoz hasonlóan történik a NAD(P)H oxidáz aktiválódása. A neutrofil sejtekben a p47phox alegység több ponton történő foszforilációját követően komplexet képez a p67phox alegységgel a citoszolban, majd a membránban található gp91phox és p22phox által alkotott komplexhez kapcsolódik. A simaizom sejtekben a p47phox fehérje aktivációja és a szuperoxidtermelés mértéke között szoros kapcsolat van.<sup>18</sup> Usio-Fukai és munkatársai igazolták a p22phox alegység fontosságát az oxidáz működésében, mely a nox1– a gp91phox alegységgel a működés szempontjából fontos szakaszokon szinte azonos – fehérjével képez komplexet.<sup>19</sup> Az endothel sejtek és fibroblasztok mellett megfigyelték a fenti alegységekkel együtt a p40phox és p67phox alegységek aktiválódását is a simaizom sejtekben.<sup>20</sup> A p40phox alegység a komplexhez kapcsolódva képes fokozni a szuperoxid képződését.<sup>21</sup>

### 3.1.4.4. A NAD(P)H oxidáz aktiválása

A NAD(P)H oxidáz aktiválásához a neutrofil sejtekben szükséges a protein kináz C (PKC) aktiválódása. Simaizom sejtekben is igazolást nyert, hogy PKC gátlók segítségével a szuperoxid termelés jelentősen csökkent.<sup>22,23</sup> Lehetséges a szuperoxid termelés indukálása foszfolipáz D (PLD) közreműködésével is, amit a PLD aktiválódása mellett

nem specifikus gátlók segítségével sikerült megerősíteni.<sup>24</sup> Az NAD(P)H aktiválódásának további lehetséges útja a lipidmetabolizmus során keletkező foszfolipáz A<sub>2</sub>, amit Holland és mtsai igazoltak.<sup>25</sup> A NADPH expresszióját fokozzák a G proteinek családjába tartozó Rac fehérjék, – melyek pl. a trombin, a homocystein, az Ang hatást követően aktiválódnak – szabadgyök-termelést indukálva.<sup>18,26</sup>

#### 3.1.4.5. A NAD(P)H oxidáz inaktiválása

A Rap1A nevű alacsony molekulású guanozin trifoszfát (GTP) kötő fehérje 1:1 arányban kötődik a citokróm b<sub>558</sub>-hoz. A Rap1A foszforilációja a C-terminális részen történik a protein kináz A (PKA) által. A foszforilációt követően a Rap1A leválik a citokróm b<sub>558</sub>-ról, miután a GTP helyett guanozin difoszfátot (GDP) köt meg. Feltételezések szerint ez a folyamat vezet egyrészt a NADPH oxidáz inaktiválásához.<sup>27</sup> A Rac-1 fehérje NAD(P)H oxidáz aktivitásának szabályozásában betöltött szerepét támasztja alá a sztatinkezelés megszüntetése kapcsán tapasztalt NAD(P)H oxidáz és szabadgyök termelődés fokozódás.<sup>28,29</sup>

#### 3.1.5. A szabad gyökök hírvivő szerepe

A szabad gyökök másodlagos hírvivő szerepét igazolták fiziológiás esetben a sejtnövekedésben, egyes gének expressziójában, a sejtek közötti adhézió szabályozásában, a hormonszintézisben, a csont reszorpcióban valamint a szöveti oxigén érzékelésében.<sup>30</sup>

A szabad gyökök másodlagos hírvivőként feltételezhetően a diszulfid hidak és thiol csoportok között lejátszódó reakciók útján fejtik ki hatásukat. Elképzelhető útja a fenti reakció szabályozásának, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnyedén lép reakcióba a sokkal kevésbé általánosan előforduló tiolát anionnal (-S<sup>-</sup>), és ez által szulfonsavat (-SOH) képez, amely fiziológiás pH-n szulfonát ion formájában van jelen.<sup>31</sup>

A sejtek másodlagos hírvivő rendszerében a O<sub>2</sub><sup>•</sup> szabad gyök ismert célpontjai a fehérje tirozin foszfatázok (PTP), melyek a katalitikus cisztein oxidálódása révén inaktiválódnak. A szabad gyökök hatásához legalább reaktív szulfhidril csoport (SH) jelenléte szükséges. Mindegyik foszfatáz rendelkezik egy ciszteint tartalmazó régióval (HCXXGXXRST) melyben történő mutáció az aktivitás elvesztéséhez vezet. Először in vitro igazolódott, hogy a -S<sup>-</sup>-csoport reakciója alacsony koncentrációjú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al a foszfatáz funkció csökkenéséhez, megszűnéséhez vezet, ami ezt követően sejtes modellben is igazolást

nyert.<sup>32,33</sup>

A NADPH által termelődött  $O_2^{\cdot}$  szabad gyök számos extracelluláris hormon, citokin és a mechanikus behatás közvetítésében játszik szerepet. A növekedési faktorok a Rac fehérjén keresztül foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-kináz) függő módon indukálják a szabad gyök termelését.<sup>34</sup> A  $O_2^{\cdot}$  szabad gyök ismert célpontjai a PTP-k, melyek a katalitikus cisztein oxidálódása révén inaktiválódnak, ily módon csökkentve számos Rac mediálta útvonal fehérjéjének foszforiláltságát.

A NADPH oxidáz által képződő  $O_2^{\cdot}$  fontos szereppel bírnak a MAPK rendszer szabályozásában. A MAPK-k a sejtek növekedésének, differenciálódásának valamint apoptózisának szabályozásában fontos feladatot látnak el, melyek redox szabályozása az egyik legjobban feltérképezett folyamat a szabadgyök-függő másodlagos hírvivő folyamatok között. A MAPK-k közé tartoznak az ERK1/2, a p38 kináz (p38), a cJUN anion terminális (JNK) kinázok. Mindegyikük foszforiláció útján aktiválódik, majd további fehérjéket foszforilálnak, melyek a nukleáris fehérjékhez tartoznak.<sup>35</sup>

A szabad gyökök számos nukleáris faktor aktiválásában játszanak szerepet. Az nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) aktiválódása mellett több kísérlet igazolta az aktivátor fehérje 1 (AP-1) - mely a Jun és Fos családba tartozó fehérjék homo- és heterodimerizációja révén képződik - az Elk-1, az SP-1 és a stressz aktiválta tirozin kináz (STAT) transzkripciós faktorok szabad gyökök hatására kialakuló fokozott működését.<sup>36,37,38</sup>

### 3.1.6. A szervezet szabad gyököket semlegesítő rendszerei

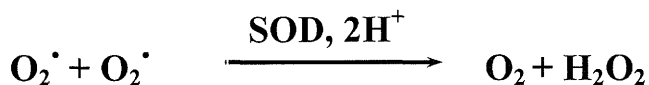
Az aerob szervezetek működéséhez oxigén szükséges. Az oxidáció kapcsán kis mennyiségben folyamatosan keletkeznek szabad gyökök. Nagy reaktivitásuk révén a környezetükben levő szinte összes molekulával képesek reakcióba lépni károsítva azokat. Ahhoz, hogy a képződött szabad gyökök hatásukat a megfelelő helyen, időben, és a kívánt célt elérve fejtsék ki, a szervezetnek szüksége van olyan rendszerre mely képes megvédeni saját magát a nem kívánt károsodástól. Ennek megfelelően többszörös önvédelem alakult ki.

Az antioxidáns rendszereknek van enzimatis és nem enzimatis része, ami magába foglalja a szuperoxid dizmutázt, a glutation peroxidázt, glutation reduktázt, a katalázt, a C vitamint, az E vitamint, a  $\beta$ -karotint, az A vitamint, a koenzim  $Q_{10}$ -t, a flavonoidokat, a  $\alpha$ -lipoidsavat, antioxidáns elemeket (Cu, Zn, Mn, Se), kofaktorokat (folsav, B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>-, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>-

vitamin) és számos antioxidáns tulajdonsággal bíró vegyületet mint pl. a karbamid nitrogén, a poliaminok, az adenzin, a cisztein, a homocisztein vagy a melatonin.<sup>39</sup>

### 3.1.6.1. A SOD

A  $O_2^{\cdot}$  szabad gyököt semlegesítő SOD először marha vvt-ből izolálták, melyet korábban haemocuprein, erythrocuprein, cerebrocuprein és hepatocuprein néven is ismertek.<sup>40</sup> A SOD két  $O_2^{\cdot}$  szabad gyök közötti reakciót katalizálva semlegesíti a reaktív molekulákat:

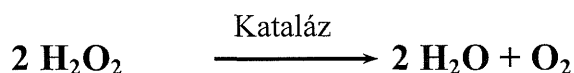


Ismert a CuZn-SOD (SOD-1), mely a citoplazmában található. A szakirodalom az extracellulárisan található CuZn-SOD-t (SOD-3) egy másik izoformának tekinti. A Mn-SOD (SOD-2) a mitokondriumokban található.

A legnagyobb mennyiségben a SOD-1 izoforma található a sejtekben. Míg az össz dizmutáz aktivitás 50-80%-ért a SOD-1 izoforma felel, addig a SOD-2 aktivitása 2-12%-a az össz dizmutáz aktivitásnak. A maradék aktivitásért felel az extracelluláris SOD.<sup>41,42,43</sup> Stressz-mentes körülmények között a sejtek szuperoxid termelésének javát mitokondriális elektron transzport lánc teszi ki. Ezért a SOD-2 tekinthető az első védelmi vonalnak a  $O_2^{\cdot}$  szabad gyökkel szemben. Az is ezt bizonyítja, hogy amennyiben a Mn-SOD teljes egészében hiányzik egerekből, születést követően néhány héten belül elpusztulnak, és már születéskor számos rendellenességgel bírnak.<sup>44,45</sup>

### 3.1.6.2. Kataláz

A kataláz 4 azonos alegységből tevődik össze. Összesen 240 kDa molekulásúlyú tetramer enzim. Szerepe a  $H_2O_2$  semlegesítésében van.



Intracellulárisan, főleg a peroxiszómákban, valamint kisebb mennyiségben a citoszolban található.<sup>46</sup>

### 3.1.6.3. Glutation, glutation peroxidáz, glutation reduktáz.

A sejtekben, legnagyobb mennyiségben található antioxidáns a glutation (0,1-10 mM).



Számos folyamatban játszik fontos szerepet: metabolizmus, transzport, katalízis, a fehérjék SH csoportjainak biztosítása, nukleinsavak termelése. Több enzim kofaktora. Nem csak az oxidatív stresszel szemben nyújt védelmet, hanem toxikus vegyületekkel és az irradációval szemben is.<sup>47</sup>

A szervezetben ciszteinből képződik  $\gamma$ -glutamil transzferáz és glutation szintetáz hatására. A redukált glutationnak (GSH) a sejtekből való kijuttatását a membránhoz kötött  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz végzi. A sejtekbe történő transzportját  $\gamma$ -glutamil aminosavakat szelektíven transzportáló rendszeren keresztül történik. A szérum glutationszintjét nagyrészt a máj biztosítja.<sup>48</sup>

Emlősejtjeiben az össz GSH 0,2%-a van oxidált glutation (GSSG) formájában jelen. Kis mennyiségben kötődik fehérjékhez.

A glutation peroxidáz (GSH-Px)  $H_2O_2$ -ot és szerves peroxidokat semlegesít GSH segítségével. A GSH-Px 4 alegységet tartalmaz, amelyek mindegyikében 1-1 Se van jelen. Napjainkig legalább öt izoenzimét azonosították.<sup>39</sup> Sokáig a GSH-Px-t tartották felelősnek a  $H_2O_2$  semlegesítéséért, mivel nagyobb affinitással bír a  $H_2O_2$ -hez, mint maga a kataláz. A GSH-Px redukálja a lipoperoxidokat, foszfolipid peroxidokat és koleszterin hidroperoxidokat is.<sup>49</sup>

A glutation reduktáz egy flavoprotein, amely a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz által termelt NADPH segítségével redukálja a GSSG-t két GSH-vá.

### 3.1.7. A szabad gyökök és a dohányzás

A dohányzás során keletkező számos vegyületnek aktív szerepe van a szervezet károsításában és ezen belül egyes daganatok kialakulásának elősegítésében.<sup>50</sup>

A dohányfüstöt alapvetően két részre osztjuk, részecske – kátrány – fázisra, melynek 99,9%-a fennakad a cigaretta szűrőjén, valamint légnemű fázisra, mely átjut a cigarettaszűrőn.<sup>51</sup> A dohány égésekor keletkezett aromás szénhidrogének, aldehidek, aromás nitrogénvegyületek, fenolok, aromás policiklikus vegyületek mellett nagy mennyiségben keletkeznek szabad gyökök.<sup>52,53</sup> A részecske fázisban a szabad gyökök mennyisége nagyobb, mint  $10^{17}$  szabad gyök/g, a gáz fázisban pedig nagyobb, mint  $10^{15}$  szabad gyök/puff. A részecske fázisban lévő szabad gyökök élettartama hosszú (hetek, hónapok), szemben a gáz fázisú szabad gyökök rövid élettartamával (másodpercek).<sup>54</sup> A dohányfüstben a szabad gyökök keletkezésének első lépéseként a szénhidrátok és fehérjék

égésekor alkének és NO keletkezik. A NO oxidációja során nitrát ( $\text{NO}_2$ ) képződik. Az így keletkezett  $\text{NO}_2$  az alkénekkal (R) reagálva alkén ( $\text{R}^*$ ), alkén oxid ( $\text{RO}^*$ ), alkén peroxid ( $\text{ROO}^*$ ) szabad gyököket képez.<sup>55</sup> Így a szerves szabad gyökök mellett a dohányfüstben található NO,  $\text{NO}_2$ , peroxinitrit és peroxinitrát.<sup>56</sup>

### **3.1.7.1. A dohányzás kardiovaszkuláris hatásában szerepet játszó szabad gyökös folyamatok**

A CV morbiditás és mortalitás egyik fő okozója a dohányzás. Elősegíti a stabil angina pectoris, az akut coronaria syndroma, a pulmonális hypertensio és a stroke kialakulását. Szerepe bizonyítást nyert az angiográfiával igazolt atherosclerosis, valamint a frissen kialakult coronaria léziók létrejöttében is.<sup>57,58,59</sup> Aktív és passzív dohányosokban egyaránt csökken az erek kontraktilitása a kontroll csoportokhoz képest.<sup>60</sup> Ezen csökkent kontraktilitás egyik elsődleges oka az NO szintézisének károsodása, amely az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) aktivitásának megváltozásával függ össze.<sup>61</sup> Szintén a NO hatékonyságának csökkenését vonja maga után a dohányfüst által fokozott aktivitású NAD(P)H oxidáz által termelt szabad gyökök. Az így keletkező  $\text{O}_2^*$  reakcióját az NO-al gyakorlatilag a diffúzió szabályozza, mely hatszor gyorsabban zajlik le, mint a  $\text{O}_2^*$  közömbösítése SOD által.<sup>62,63</sup> A myocardialis infarctus kialakulása és a thrombosis szempontjából fontos megemlíteni, hogy a dohányzás fokozza a trombociták aggregációs képességét is, amiben fontos szerepet játszanak szabadgyökös mehanizmusok.<sup>64</sup>

A dohányfüst megnöveli a periférián található leukociták számát, valamint számos gyulladásos marker szérumszintjét.<sup>54,65</sup> Ismert az is, hogy a dohányfüst elősegíti a monocyták adhézióját az endothel sejtekhez egyben fokozva migrációjukat a szövetekbe.<sup>66,67</sup> Az atherosclerosis szempontjából kedvezőtlenül befolyásolja a lipidprofil alakulását. Emelkedik a szérum triglicerid (TG) és koleszterin, valamint csökken a nagy denzitású lipoprotein (HDL)-koleszterin szint, amellyel azonos irányú változások figyelhetők meg inzulin rezisztenciában.<sup>68,69</sup> Yamaguchi és munkatársai napjainkban igazolták, hogy dohányfüst vizes oldata hiperlipidémiás nyulakban az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) oxidációja révén felgyorsítja az atherosclerosis kialakulását.<sup>70</sup>

### **3.1.8. Az előrehaladott glikációs végtermékek és a szabad gyökök**

A figyelem a kardiovaszkuláris betegségekkel kapcsolatban a táplálkozás egészségtelen

voltára is kiterjedt. Fény derült az ételek elkészítésekor keletkező, a gasztrointesztinumban felszívódó glikációs végtermékekre. Az előrehaladott glikációs végtermékekről bebizonyosodott, hogy a szervezetben szabad gyökök keletkezését indukálják.

### 3.1.8.1. Az előrehaladott glikációs végtermékek keletkezése és eliminációja

A redukáló cukrok kapcsolódva az aminosavak vagy a fehérjék amino csoportjaihoz labilis Schiff bázist alkotnak a Maillard reakció első lépéseként. Ezen első lépést követve több reakció során alakulnak ki a sokkal stabilabb - Amadori termékeknek nevezett – ketoaminok.<sup>71</sup> Az Amadori termékekből lebomlásuk folyamán további igen reakcióképes vegyületek jöhetnek létre, mint a 3-deoxiglukozon az MG és a glioxál. A glikációs végtermékek keletkezésének több útja ismert a fenti klasszikus útvonal mellett. Ezen reakcióutak során szintén a már említett három dikarbonil vegyület keletkezik. Dikarbonil vegyületek keletkeznek a szénhidrátok, Schiff bázisok és Amadori termékek vas katalizálta autooxidációja kapcsán, oxidatív stressz során valamint lipidperoxidáció révén is.<sup>72,73,74,75</sup> Nem oxidatív módon szintén keletkezik MG és 3-deoxiglukozon acetontól, trióz foszfátokból, valamint fruktóz-3-foszfátból. A keletkezett dikarbonil vegyületek felhalmozódását karbonil stresszként is ismerjük.<sup>72</sup>

Glikációs végtermékek nem csak in vivo, hanem in vitro is keletkeznek. Így a dohányzás és a táplálék elkészítése kapcsán is létrejönnek AGE termékek.<sup>76,77</sup> A dohányosok szérumban, szemlencséjében és érfalában magasabb az AGE koncentrációt mértek, mint a nem dohányzókéban, ami a dohányzás során keletkező AGE-k felszívódására vagy fokozott képződésére utal.<sup>78,79</sup> A táplálékok hőkezelése kapcsán szintén keletkeznek AGE-k.<sup>80,81</sup> A hőkezelés a fehérje és szénhidrát tartalmú ételek AGE tartalmát kb. 10-szeresére, míg a zsírtartalmú ételek AGE tartalmát kb. 100-szorosára növeli.<sup>82</sup> Az AGE mellett nagy mennyiségben találtak az ételekben hőkezelés hatására keletkező MG-t is.<sup>83</sup>

Radioizotópos vizsgálatokkal mind állatkísérletekben, mind humán vizsgálatokban sikerült igazolni, hogy a szérumban a táplálékkal bevitt AGE 10%-a jelenik meg. A felszívódott AGE-t a retikuloendotheliális rendszer sejtjei veszik fel az AGE-receptorokon keresztül.<sup>84</sup> Ezen sejtekben az AGE lebontását követően AGE peptidek jönnek létre, melyek a keringésben kerülve fejtik ki károsító hatásukat keresztükötések létrehozásával.<sup>85</sup>

Igazolták, hogy az AGE-termékek kizárólag a vesén keresztül ürülnek a szervezetből.<sup>86</sup> A felszívódott AGE–ovalbuminhoz köthető radioaktivitásnak csak 30%-a eliminálódik az

étkezést követő 72 órában a vizelettel. Az aminoguanidin fokozta az AGE-termékek renális eliminációját, és egyidejűleg csökkentette a szöveti akkumulációjukat is.<sup>82,83</sup>

### 3.1.8.2. A glikációs termékek által aktivált hírvivő rendszerek

Diabetes mellitusban valamint végstádiumú vesebetegekben megfigyelhető a glikációs végtermékek fokozott képződése és felszaporodása a szövetekben. Az AGE termékek felszaporodása következtében kóros folyamatok indulnak el sejt-szöveti szinten. A glikációs végtermékek hatásukat receptorokhoz kötődve fejtik ki. Az AGE immunglobulin szupercsaládba tartozó receptora nevét az angol „receptor for AGE”-ből kapta, rövidítve RAGE (AGE receptor). A RAGE egy 45 kDa molekulatömegű fehérje. A fenti receptoron kívül glikációs termékeket köt meg a makrofágok scavenger receptorainak I és II típusa, az AGE receptor komplex elemei, a galectin-3 (AGE-R3), az oligosaccharyl transferáz complex protein 48 (AGE-R1), a lactoferrin, a 80K-H fehérje (AGE-R2), a lysosyme, az SRA és a CD 36 is.<sup>87,88,89,90,91,75</sup>

Az AGE-k kapcsolódva a sejt felszíni receptoraikhoz szabad gyökök képződését indukálják. Az AGE-kiváltotta szabadgyök-képződésben szerepe van a NADPH oxidáz rendszernek.<sup>92,93</sup> A NADPH oxidáz aktiválása mellett az AGE-k számos további fehérje foszforilálását indukálják – mint pl. a MAPK-k, p21ras, PI-3 kináz, cdc42/rac, Jak/STAT. Aktiválják a redox szenzitív NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort, melyen keresztül gyulladás gének transzkripcióját indítják el [tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), TNF- $\beta$ , IL-1 (interleukin), IL-6, IL-8, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), adhéziós molekulák].<sup>94,95,96</sup> A fenti folyamatok mindegyike gátolható volt AGE ellenes antitesttel vagy szolúbilis RAGE-val.

### 3.1.8.3. A vas anyagcsere, az oxidatív stressz és a nem enzimátikus glikáció kapcsolata

A vas átmeneti fémként elektron felvételére és leadására képes  $Fe^{2+}$  valamint  $Fe^{3+}$  formájának köszönhetően. Fenti tulajdonságának következtében nélkülözhetetlen több enzim működéséhez, az oxigén transzportjához, a citokróm rendszer működéséhez. Viszont e sajátossága teszi veszélyessé egyes szervezetben belüli káros folyamatok katalizálásával.

Egy felnőtt ember szervezetben 35-45 mg vas van kilogrammonként. A vas kb. 80%-a a hem fehérjék felépítésében vesz részt, 10-15%-a a mioglobin alkotórésze, a fennmaradó

hányad pedig enzimekben található. A vas felvétele a gasztrointesztinális traktusban kizárólag a duodenum területén zajlik. Egyrészt a gyomorban az alacsony pH-nak köszönhetően  $\text{Fe}^{2+}$ -ná alakul a táplálék  $\text{Fe}^{3+}$  ionja, valamint ugyanezen átalakulást segíti elő a bélbolyhok divalens fém transzporteréhez csatlakozva található ferri reduktáz.<sup>97</sup> Egy nem specifikus fém transzporter segítségével jut a bélbolyhok sejtjeibe a vas. A hem vas felvétele egy ettől eltérő, kevésbé tisztázott folyamat útján történik. A sejtekbe jutott vas ezt követően ferritin formájában raktározódik vagy – egy napjainkban azonosított fehérje a – ferroportin segítségével jut a keringésbe a bazolaterális oldalon, ahol szállítását a transferrin végzi.<sup>98</sup> A plazmában transferrin által szállított vasat a transferrin receptor segítségével veszik fel a szövetek. Szervezetünk fő vas raktárai a máj és a makrofágok. A sejtek vas homeosztázisukat a transferrin receptor és a ferritin szintézisének szabályozásával képesek befolyásolni.<sup>99</sup>

Azon betegségekben, melyekben fokozott oxidatív stresszel találkozunk, mint pl. diabetes mellitus, krónikus veseelégtelenség, krónikus fertőző betegségek a vas anyagcsere károsodása is megfigyelhető.<sup>100,101,102, 104</sup> Ugyanezen betegségekben figyelték meg a vas felszaporodását a vasraktárakban, valamint a vas felszabadulását az intracelluláris raktárakból.<sup>104,103,105</sup> A mobilizált, „szabad” vagy „labilis” vas – mely szinte azonnal komplexet alkot citráttal vagy adenozin difoszfáttal (ADP) - szabad gyökös reakciókat képes katalizálni a Fenton és a Haber-Weiss reakciók keretében, valamint katalizálja az AGE képződés oxidatív lépéseit.<sup>106</sup> Tehát a vas homeosztázisának a felborulása elősegíti a szabad gyökök fokozott képződését, ez által pedig katalizálja a glikációs végtermékek képződését.

### 3.2. Az intracelluláris kalcium

Az intracelluláris kalcium szintje számos betegségben tér el a normálistól, többek között hypertóniában, obesitasban, inzulin rezisztenciában. Az extracelluláris 2,1-2,5 mmol/l kalcium szint több mint 20000-szerese a kb. 100 nM-os intracelluláris szintnek. Az emelkedett intracelluláris kalcium szint, pedig a sejtek károsodásához, végül sejthalálhoz vezet. Ennek ismeretében feltételezhető, hogy a sejtek intracelluláris kalcium szint szabályozása több módon történik.<sup>107</sup>

A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szabályozásának bonyolultságára utal, hogy mind időbeni, mind térbeni változása mellett lehet átmeneti vagy oszcilláló jellegű a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változása. Ezzel

magyarázható, hogy a különböző stimulusok hatására más és más útvonalak aktiválódnak a  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedésének hatására. A  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedéséhez vezetnek, pl. az inozitol trifoszfát ( $IP_3$ ), a ciklikus adenosin difoszfát ribóz (cADPR), a  $H_2O_2$ , a  $O_2^{\cdot}$ , a diacilglicerol, az arahidonsav, az Ang, a szfingozin, a szfingozin-1-foszfát és maga a kalcium. Tekintettel a hírvivőként betöltött szerteágazó szerepére csak e tanulmányban szereplő területekkel való kapcsolatát taglaljuk.<sup>108,109</sup>

### 3.2.1. Az intracelluláris szabad ionizált kalcium szint szabályozása

A intracelluláris, szabad ionizált kalcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) szintet alapvetően annak felvétele és eliminációja közötti egyensúlyi állapot határozza meg. Felvétele elsősorban a feszültségfüggő kalcium csatornákon és a transiens receptor potential (TRP) homológ csatornákon, a ligand specifikus kation receptorok,  $[Ca^{2+}]_i$  által szabályozott kation csatornák, nem specifikus kation csatornák, purinerg receptorok és a szívizomban található,  $Na^+/Ca^{2+}$  csatornán keresztül zajlik. Az intracelluláris raktárakban levő kalcium mobilizálásában szerepet játszó inozitol 1,4,5-trifoszfát ( $IP_3$ ) érzékeny receptorok szinte minden sejtben megtalálhatóak.<sup>110</sup> Az  $[Ca^{2+}]_i$  sejtekből történő kiürítéséért a plazma membrán  $Ca^{2+}$ -ATP-áz és a  $Na^+/Ca^{2+}$ -csatorna felelős.<sup>111</sup>

A  $[Ca^{2+}]_i$  szintjének szabályozásában a fentiek mellett fontos szereppel bírnak a sejtek kalciumot kötő, raktározó egységei. Intracellulárisan alapvetően megkülönböztetjük a kalciumot raktározó endoplazmatikus retikulumot (ER), a mitokondriumokat, a Golgi szervet és a kalciumot kötő fehérjéket.<sup>107</sup>

Az ER - mely az egész sejtet behálózza - a citoszolban a stimulusok hatására megjelenő  $[Ca^{2+}]_i$  legjelentősebb forrása. Az ER membránjában levő  $Ca^{2+}$ -ATPáz-ok (sarco- vagy endoplazmatikus-retikulum  $Ca^{2+}$ -ATP-áz (SERCA)) egyik izoformája juttatja a  $[Ca^{2+}]_i$ -ot az ER-ba, ahol azt a calsequestrin nevű fehérje köti meg.<sup>112</sup>

A mitokondriumok szintén képesek kalciumot raktározni, amely elérheti a 0,5 mM-os szintet is. A mitokondrium kalcium csatornái kisebb affinitással bírnak a  $[Ca^{2+}]_i$  iránt, mint az ER-ban található csatornák és csak az  $[Ca^{2+}]_i$  330 nM-os szint fölé történő emelkedése után fejtenek ki jelentősebb aktivitást.<sup>113</sup> A  $[Ca^{2+}]_i$  kórosan magas szintje a mitokondriumokban olyan folyamatokat indíthat el, ami apoptózishoz vezet.<sup>114</sup>

A Golgi szerve szintén képes kalcium felvételére  $IP_3$  hatására.<sup>115</sup>

### 3.2.2. A kalcium szerepe a nitrogén monoxid szintáz aktiválásában

A nitrogén monoxid szintáz (NOS) két fő izoformáját különböztetjük meg, a konstitutív nitrogén monoxid szintázt (cNOS) és az indukálható nitrogén monoxid szintázt (iNOS). A cNOS két formája az eNOS és az neuronális nitrogén monoxid szintáz (nNOS). Az eNOS a citoszolban helyezkedik el. Az nNOS-hoz hasonlóan, a  $[Ca^{2+}]_i$  szintet növelő bradikinin, hisztamin, szerotonin, adenzin, trombin, kalcium ionofor, ösztadiol, ér endothel növekedési faktor (VEGF) aktiválja az eNOS-t is. A fentiektől függetlenül a  $[Ca^{2+}]_i$  szint változásától függetlenül is aktiválódhat az eNOS, pl. nyíróerő hatására.<sup>116,117</sup>

A  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedése következtében a kalmodulin (CM) kalciumot kötve kapcsolódik az eNOS-hoz, ez által hozzájárulva a cNOS aktiválásához. Az aktiválás úgy történik, hogy a  $Ca^{2+}$ -CM komplex kapcsolódik a NOS-hoz, annak gátló doménje leválik a hem molekuláról így lehetővé téve, az addig gátolt, elektron transzfert. Ezt követően több egyéb kofaktor segítségével a NOS, NO-ot képez arginin-ből molekuláris oxigén jelenlétében.<sup>118,119</sup> A cNOS aktiválódása rövid idejű, pikomoláris mennyiségű, NO termeléssel jár, mely az eNOS esetében szinte kizárólag a caveolákban figyelhető meg. A caveolában levő eNOS gátlása szempontjából fontos szerepet feltételeznek a caveolin-1 nevű fehérjének, mely megakadályozza, hogy a CM elektront továbbítson a hem alegységnek. A caveolin-1 expressziójának fokozódása gátolja az eNOS működését.<sup>120</sup>

### 3.2.3. A nitrogén monoxid szerepe az intracelluláris kalciumszint csökkentésében

A NOS által termelődött NO, a guanilát cikláshoz kapcsolódva aktiválja azt, ami cGMP termelést eredményez.<sup>121</sup> A cGMP közvetlenül is képes csökkenteni a  $[Ca^{2+}]_i$  szintet, a protein kinázokon, továbbá az ER  $Ca^{2+}$ -ATPázon keresztül.<sup>122</sup>

## 3.3 A renin - angiotenzin – aldosteron rendszer

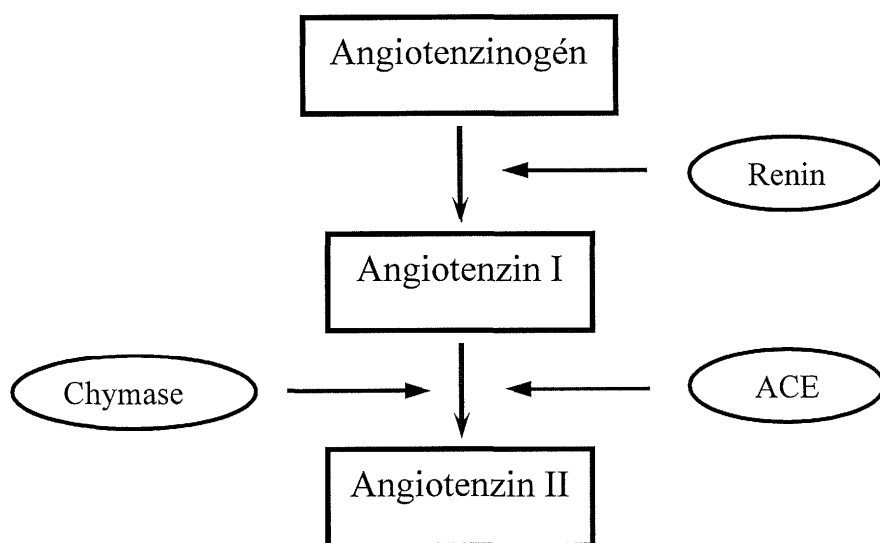
A szervezet egyik legrészletesebben feltérképezett endokrin rendszere a renin - angiotenzin – aldosteron rendszer (RAAS). A rendszer első felfedezett eleme a renin. A 340 aminosavból álló renin preproreninből képződik, proreninen keresztül. A prorenin kallikrein hatására alakul át reninné. A renin a szervezetben elsősorban a vesében termelődik, az afferens arteriola falában levő sejtekben, az arteriola glomerulusba lépése előtt. A keringésbe került renin hatására keletkezik az angiotenzin I angiotenzinogénből. Az angiotenzin I-et az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) alakítja át angiotenzin II-vé,

melynek az aldosteron (Ald) termelésére és a vérnyomásra kifejtett hatása mellett számos egyéb szerepe van.<sup>123</sup>

### 3.3.1. Az angiotenzin II (Ang)

Az Ang egy nyolc aminosavból álló polipeptid mely az angiotenzin I-ből keletkezik (2. ábra).

Az Ang gyorsan elbomlik a szervezetben. Félélettideje 1-2 perc a keringésben. Inaktiválását aminopeptidázok végzik, melyek az N-terminális aszparaginsavat hasítják le, létrehozva az angiotenzin III-at, mely gyengébb vérnyomást emelő hatása mellett az Ald elválasztást azonos mértékben serkenti, mint az Ang.



#### 2. ábra Az angiotenzin II képzése angiotenzinogénből

Hatása sokrétű. Részt vesz a vérnyomás, az extracelluláris térfogat és a só-, folyadék háztartás szabályozásában. Vazokonstriktiót okoz, és mint már említettük, fokozza az Ald termelését, valamint szekrécióját és a szimpatikus idegrendszer aktivitását. Serkenti a  $\text{Na}^+$  visszaszívását, gyulladásozó folyamatokat indít el. A növekedést és a sejtek osztódását serkentő hatása mellett képes gátolni a sejtnövekedést. Fokozza többek között a bradikinin és az NO képződését. Apoptózist indukálhat.<sup>124</sup>

#### 3.3.1.1. Az Ang receptorai és az azokon keresztül kifejtett intracelluláris hatások

Hatását két receptoron keresztül fejt ki, az angiotenzin receptor 1-en ( $\text{AT}_1$ ) és az



angiotenzin receptor 2-n ( $AT_2$ ). Az  $AT_1$ -es receptor két altípusát különböztetjük meg, az  $AT_{1a}$ -t és az  $AT_{1b}$ -t.<sup>124</sup>

A felnőtt szervezetben az  $AT_2$  receptoron keresztül kifejtett hatásaival kapcsolatban ellentmondásos eredményeket közöltek. Vazodilatációs folyamatokat serkent, fokozva a bradikinin, a NO és a cGMP termelését. Hatásainak egy részéért egyes foszfatázok aktiválása felelős. Nincs hatással a  $[Ca^{2+}]_i$  szintre, nem növeli az IP-3, valamint hatástalan a ciklikus adenosin monofoszfát (cAMP) és a cGMP szintre is.<sup>125</sup>

Döntően az  $AT_1$  receptora tehető felelőssé az Ang további hatásaiért. 359 aminosavból álló 41 kDa molekulásúlyú fehérje. Hét transzmembrán doménnel rendelkező receptor családdhoz tartozik, mely G-protein kapcsolt. A G-proteinek aktiválódása szempontjából a citoszolban található tirozin (Tyr)<sup>127</sup>-től az izoleucin (Ile)<sup>130</sup>-ig található szakasza fontos. Egyes eredmények arra engednek következtetni, hogy az Ang kiváltotta IP-3 képződés G-protein függő folyamat, míg az ERK aktiválódása – meglepő módon, számos egyéb kutatócsoport eredményeitől eltérően -  $\beta$ -arrestin függő.<sup>126</sup>

Az Ang az  $AT_1$  receptoron keresztül több intracelluláris útvonalat aktivál, mint pl. a foszfolipideket, nem receptor tirozin kinázokat, receptor tirozin kinázokat, a MAPK kaszkádot, kis molekulásúlyú G proteineket és szabad gyökök termelését váltja ki. Ezen útvonalak segítségével aktiválódik számos protoonkogén - melyek közé tartoznak a c-fos, c-jun, c-myc, erg-1, VL-30 - és növekedési faktor is - trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF), epiteliális növekedési faktor (EGF), transforming növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ), inzulin-szerű növekedési faktor-1 (IGF-1), fibroblaszt növekedési faktor (FGF). Az NF- $\kappa$ B és AP-1 mellett adhéziós molekulák, kemotaktikus anyagok és vazokonstriktorok termelését stimulálja.<sup>124</sup>

A sejteket növekedésre serkentve, az extracelluláris mátrix összetételére, felépítésére hatva befolyásolja a szövetek és az érfal felépítését. Fokozza a fibronectin, az 1-es típusú kollagén, a glükózaminoglikánok termelését. Növeli a plazminogén aktivátor gátló-1-es aktivitását, befolyásolja a fibrinolízist és a trombocita aggregációt.

### 3.3.2. Az aldosteron (Ald)

Az Ald egy szteroidhormon, mely a mineralokortikoid-hatás kb. 90%-ért felelős. Termelését az Ang stimulálja. Ezen kívül az Ald elválasztását fokozza a hiperkalémia, az adrenokortikotropin (ACTH), valamint szabályozásában részt vesznek a nátrium és

hidrogén ionok. A keletkező Ald  $\text{Na}^+$ -retenciót okoz, fokozza a  $\text{Mg}^{2+}$  és a  $\text{K}^+$  ürítését. Fokozza a szimpatikus aktivitást, gátolja a paraszimpatikus aktivitást. Fibrózist indukál a szívizomzatban és az érfalban. Vaszkuláris károsodást indukál, baroreceptor diszfunkciót vált ki.<sup>127</sup> Az intracellulárisan kifejtett hatás mechanizmusát alapul véve megkülönböztetjük gyors, nem-genomikus és genomikus hatását.

Napjainkban reneszánszát éli az aldoszteronnal kapcsolatos kutatás. A RALES (randomized aldactone evaluation study) tanulmányban közölt adatok - ahol igazolták, hogy posztinfarktusos betegeknél a mineralokortikoid receptor gátló spironolakton jelentősen csökkenti a mortalitást – ismét a mineralokortikoidra és receptorblokkolóira terelték a figyelmet. A szelektív mineralokortikoid receptor gátló Eplerononnal az EPHEBUS (eplerenone post acute myocardial infarction efficacy and survival study) tanulmányban azonos eredményre jutottak a posztinfarktusos mortalitást illetően.<sup>128,129</sup>

### 3.3.2.1. Az Ald szintézise és eliminációja

Az Ald koleszterinből szintetizálódik 11-deoxykortikoszteronon keresztül, a mellékvese zona glomerulózájában.<sup>130</sup>

A szintézis első lépéseként a koleszterin a mitokondriumba transzportálódik a szteroid akut szabályozó fehérje (StAR) révén. Ott pregnenolonná alakul (citochrom P450 enzim által –  $\text{P450}_{\text{scC}}$ ), majd a pregnenolon az ER-ba szállítódik. Az ER-ban progeszteronná alakul a 3-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz által. Ez követően szintén egy cytochrom enzim, a 21-hidroziláz ( $\text{P450}_{21}$ ) 11-dezoxikortikoszteront képez a progeszteronból, ami visszakerül a mitokondriumba, ahol az kortikoszteronná alakul, amely lépést az ezt követőkkel együtt egy mitokondriumban levő cytochrom P450 enzim szabályozza. Ezen enzim az aldoszteron szintáz (CYP11B2) melynek 5' promotere felelős az Ang II szabályozó funkciójáért. A CYP11B2 a mellékvesében kizárólag a zona glomerulusban található. Az aldoszteron-szintáz katalizálja az Ald szintézis utolsó lépéseit, a 11-deoxykortikoszteron 11 $\beta$ -hidroxilációját, a kortikoszteron 18-hidroxilációját és a 18-hidroxikortikoszteron 18-oxidációját Ald-dá.<sup>130,131</sup>

A szintézist számos ion, peptid, citokin, hormon befolyásolja. Mint már említettük, az Ang, a magas  $\text{K}^+$  továbbá az ACTH stimulálják. A szintézist gátolják az alacsony  $\text{K}^+$  szint, a hiponatrémia, a dopamin, az ANP valamint az Ang stimulálta Ald szintézist az adrenomedullin és a proadrenomedullin N-végű peptid.

Az Ald féléletideje kb. 20 perc, koncentrációja a plazmában 0,06 µg/l. Nagy része a májban tetrahidroglükuronid származékká alakul. 1%-nál kisebb része ürül változatlan formában a vizelettel.

### 3.3.2.2. Az Ald nem-genomikus hatása

Az Ald-nak megkülönböztetjük genomikus és nem-genomikus hatását. A nem-genomikus hatásért felelős lehet egy specifikus ligand-receptor kapcsolat vagy nem specifikus kötődés fehérjékhez, lipidekhez. Ez a folyamat mind a mai napig tisztázatlan.

Az Ald nem-genomikus hatását számos sejten, szöveten sikerül megfigyelni, többek között epiteliális sejteken (vese tubuláris sejtjei, vastagbél epithelium), endothel sejteken, leukocitákon, simaizom sejteken, szívizom sejteken.<sup>132</sup>

A vese disztális tubuláris sejtjeiben az Ald alkalmazását követő kevesebb, mint 5 percen belül megváltoztatja az intracelluláris pH-t, mely hatás amiloriddal gátolhatónak bizonyult, szemben a spironolactonnal. Az Ald cicloheximiddel és actinomycin-D-vel nem gátolható módon növeli az intracelluláris Na<sup>+</sup>, és kalcium szintet, valamint a sejtterefogatot.<sup>133,134,135</sup>

Ez az Ald gyors, nem-genomikus hatását igazolja, ahol a hatás érvényesüléséhez nem szükséges transzkripció és transláció. Figyelemre méltó, hogy a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-ázra kifejtett hatás már 1-2 percen belül jelentkezik. Az Ald hatására megfigyelhető volt az IP-3 30 másodpercen belüli szignifikáns emelkedése a sejtekben. A [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedése 2-3 perccel követi az Ald stimulációt. Az Ald ezen hatását spironolactonnal nem sikerült kivédeni.<sup>136</sup> Aktiválja a PKC-t, növeli a sejtek cAMP szintjét. Szívizom sejtekben növeli a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> kotranszporter aktivitását. Számos tanulmány veti fel egy nem mineralokortikoid receptor (MR) meglétét, azonban napjainkban egyre több kísérlet utal arra, hogy azon hatások legalább egy része, melyeket nem-genomikusnak tartottunk a klasszikus intracelluláris MR-en keresztül történik.<sup>137</sup>

A nem-genomikus hatások között tartják számon az Ald epiteliális növekedési faktor receptor (EGFR) és ERK1/2 aktiváló képességét, mely a stimulációt követő 5 percen belül jelentkezik.<sup>138,139</sup>

Az in vitro kísérletek mellett egészséges önkénteseken végzett vizsgálatok során Ald adását követően a szisztémás vaszkuláris rezisztencia már 3 perccel a beadást követően megemelkedett.<sup>140,135</sup> A szisztémás vaszkuláris rezisztencia emelkedését napjainkban egészséges önkénteseken végzett tanulmány erősítette meg az Ald adását követő 30.

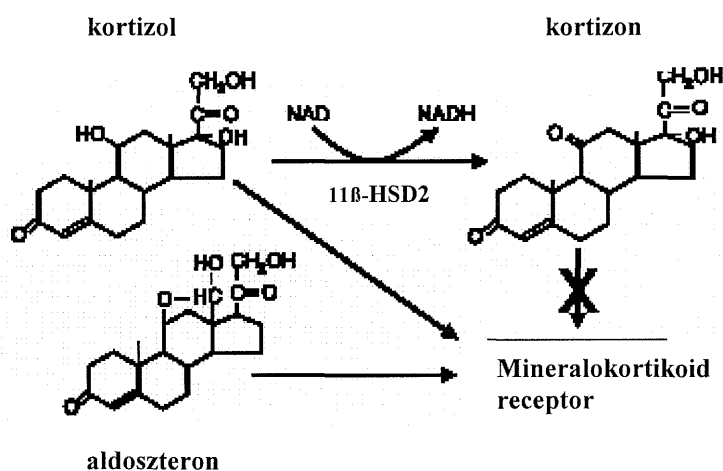
percben is, változatlan szívfrekvencia mellett.<sup>141</sup>

### 3.3.2.3. Az Ald genomikus hatása és az MR

Az Ald klasszikus hatását az intracellulárisan található MR-hez kötődve fejt ki. Az MR-hez kötött Ald alkotta komplex a sejtmagba jutva mRNS átírásán keresztül, fehérjék szintézisét indukálja.

Fő hatása a vese eipiteliális sejtjein a  $\text{Na}^+$  és a  $\text{Cl}^-$  reabszorpció, valamint a  $\text{K}^+$  és  $\text{H}^+$  excretió fokozása. A  $\text{Na}^+$  transzportját fokozza a vese disztális tubulusain kívül a colon disztális részén és a nyálmirigyekben, az amilorid szenzitív eipiteliális  $\text{Na}^+$  csatornán (ENaC) keresztül. A bazolaterális membránon, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-ázon keresztül katalizálja az aktív transzportot.<sup>131</sup>

A glukokortikoid receptorról (GR) nyert ismereteink nagy része alkalmazható az MR-ra is, bár a hasonlóság ellenére nagy különbségek is vannak a két „testvér” között. Az MR specifikus ligandja az Ald, mely nanomólos koncentrációban képes aktiválni azt. Az MR-t a kortizol is képes aktiválni viszont csak az Ald koncentrációjánál kb. 1000-szer magasabb koncentrációban. Ez köszönhető egyrészt a sejtek  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2 tartalmának ( $11\beta\text{HSD2}$ ), mely a kortizolt elhanyagolható aktivitással rendelkező kortizonná alakítja.<sup>142</sup> Az Ald specificitásáért felelős más részről az MR felépítése.



### 3. ábra: A mineralokortikoid receptoron hatást kifejtő szteroid hormonok

Az MR és a GR felépítése nagy hasonlósággal bír a centrálisan található dezoxiribonukelinsav (DNS) kötő domént valamint a C-terminális ligand kötő domént

illetően. Az N-végű régió nagy variabilitással rendelkezik, mind az aminosav szekvenciáját mind azok hosszát illetően.<sup>143,144</sup> A receptorok által indukált gének transzkripciójának specificitásáért a DNS kötő domén felelős. Ennek köszönhető a GR és MR indukált folyamatok közötti hasonlóság.<sup>145</sup>

Az Ald hiányában az MR a citoplazmában helyezkedik el, elsősorban egy protein komplexhez kapcsolódva, mely hősokk fehérjékből (hsp90, hsp70), valamint immunofilinekből (FKBP52, FKBP54, CyP40) áll. Az Ald receptorhoz kötődése a komplex disszociációját és foszforilációját okozza. Az Ald-t kötő receptor a sejtmagba transzlokálódik ahol specifikusan kötődik DNS promoter régiókhoz. Az MR specifikusan kapcsolódik az aktivált STAT-1 fehérje gátlójához, mely szabályozza a transzkripciós aktivitását.<sup>146</sup> Az aldosteron rövid latencia idővel emeli a szérum és glükokortikoid szabályozott kináz (Sgk1) mRNS szintjét, amely Sgk1 az ENaC szabályozó fehérjén - a Nedd2-4 foszforilálásán - keresztül aktiválja az ENaC-t.<sup>147</sup> Szabályozza az ENaC  $\alpha$ -,  $\beta$ -, és  $\gamma$ -alegységének, valamint a  $K^+$ -csatornát indukáló faktornak a transzkripcióját is. A fentiek mellett más Ald szabályozott géneket is azonosítottak, mint a transzporter indukáló faktor, valamint proto-onkogéneket, többek között K-Ras2, c-Myc, c-Jun, c-Fos, Fra-2.<sup>148</sup>

#### 3.3.2.4. Az Ald hatása a kardiovaszkuláris rendszerre

Az Ald hatása a só-, vízháztartásra valamint a CV rendszerre évtizedekkel ezelőtt igazolást nyert.<sup>140</sup> Jelenleg az Ald azon hatásai állnak a kutatások homlokterében, melyek a betegségek prognózisa szempontjából jelentőséggel bírnak.

Az MR jelenléte számos technikával nyert igazolást a vese gyűjtőcsatornáinál mellett a szívizomsejtekben, fibroblasztokban, simaizomsejtekben, endothelsejtekben. Rocha és munkatársai kimutatták, hogy az Ald infúzióban adva fibrózist indukál patkányok szívében.<sup>149</sup> Több kísérlet igazolta, hogy az MR receptor mellett a RAAS többi eleme is jelen van a CV rendszer sejteiben, az érfalban és a szívben.<sup>150,151,152</sup> Ez felvetette a RAAS elemeinek parakrin-autokrin szerepét egyes CV betegségek patogenezisében. Az Ang a mellékvese mellett a szívben is Ald-elválasztást indukál, melynek simaizom hipertrofiát kiváltó szerepét annak Spi-nal történő gátlhatóságával sikerült bizonyítani.<sup>153,154</sup> Magas vérnyomással rendelkező betegekben szoros korelációt sikerült igazolni a bal kamrai hipertrofia és a szérum Ald szintje között.<sup>155</sup> In vitro kísérletben az Ald fokozta az endotelin-1 szívizom sejtekre kifejtett hipetrofizáló hatását.<sup>156</sup> Az NF- $\kappa$ B szerepének

ismeretében szintén figyelmet érdemel az a felfedezés, hogy egyes Ald által aktivált gének a glukokortikoid indukálta leuzin zipper (GILZ) fehérjét kódolják, mely az NF- $\kappa$ B-vel történő interakciója révén szabályozza a T-sejt aktiválást.<sup>157,158</sup>

A humán MR-t is hordozó egerekben az MR túlzott expressziója mellett a szív dilatációja volt megfigyelhető, fibrózis nélkül.<sup>159</sup> A 11 $\beta$ HSD2 túlexpresszáldása a szívizomzatban, a vérnyomás megváltozása nélkül okozott hipertrófiát és fibrózist. A RALES és EPHEBUS tanulmányok bizonyították az Ald CV patogenezisében betöltött fontos szerepét, a Spi és az eplerenon eredményes morbiditást és mortalitást csökkentő hatásával.<sup>160</sup>

### 3.4 A MAPK

A MAPK-ok a szerin-treonin kinázok családjába tartoznak, melyek számos sejtet, szervezetet érő hatás (citokinek, hormonok, növekedési faktorok, neurotranszmitterek, stressz, stb.) következtében aktiválódnak. A szervezet minden sejtjében megtalálhatóak. A MAPK modul három kinázt foglal magába, melyek egymás után aktiválódnak, a MAPK kináz kináz (MKKK), a MAPK kináz (MKK) valamint a MAPK. Több fajta MAPK található a sejtekben, melyek más-más szereppel rendelkeznek. Az emlősökben több MAPK családot sikerült azonosítani, az ERK1/2, a JNK, a p38 kinázok különböző izoformáit, az extracellulárisan szabályozott kináz (ERK) 3 és 4, valamint az extracellulárisan szabályozott kináz 5 (ERK5).<sup>161</sup>

#### 3.4.1. Az ERK 1/2

Az ERK 1/2 modul magába foglalja a MKKK-okat - A-raf, B-Raf és Raf-1 -, a MKK-okat - MEK1 és MEK2 – és a MAPK-okat - az ERK1 és ERK2. Itt az alig feltérképezett ERK3/4-ről nem teszünk említést.

A MAPK család legrészletesebben tanulmányozott résztvevője az ERK 1 és ERK 2 kináz (más néven p44 és p42 kináz). Az ERK 1-ben és az ERK 2-ben található aminosav szekvencia 83%-ba egyezik meg. G protein kapcsolta receptorok aktiválják őket, általában receptor tirozin kinázokon (EGFR, PDGFR, IGFR) keresztül. A MKKK-ok szerin/treonin kinázok, melyek a threonin (Thr)-X-tyrozin szakaszt felismerő MKK-okat aktiválják. A MKK-ok kettős specificitású kinázok, tehát threonint és tyrozint is képesek foszforilálni. Az ERK 1/2 aktiválását a Thr-X-Tyr szakasz foszforilálásán keresztül végzik, ahol a Thr-183 és Tyr-185 aminosavak foszforilálódnak. Ez által aktivitásuk több mint 1000x-re

növekszik. A MAP kinázok prolin irányított kinázokként prolin (Pro)-X- szerin (Ser)/Thr-Pro szakaszokat foszforilálnak.<sup>162</sup>

Az ERK 1/2 számos extracelluláris stimulus hatására aktiválódik. A receptor tirozin kinázok megfelelő liganddal kapcsolódva aktiválódásukat követően adapter fehérjéket (Shc, Grb2, Sos) kötnek meg, amit követően az EGFR Ras GDP-je GTP-re cserélődik. A Ras-GTP aktiválja az MKKK-t, ami végső soron az ERK 1/2 aktiválódásához vezet.<sup>163,164</sup> Egyes citokin receptorok szintén képesek aktiválni az ERK 1/2-t, Src tirozin kinázok (Lck, Lyn, Fyn) valamint a JAK aktiválása révén.<sup>165</sup> G-protein-kapcsolt receptorok szintén aktiválják az ERK 1/2 útvonalat. Ezen csoporthoz tartozik az Ang receptora, az AT<sub>1</sub>, mely szintén aktiválja az ERK 1/2-t. A fentiek mellett az integrinek csoportosulása, kapcsolódása aktiválja az útvonalat, mely részben az Rho nevezetű GTP-áznak köszönhető.<sup>166</sup>

Az ERK 1/2 olyan további útvonalakat serkent fokozott működésre - aktiválja többek között az Elk-1, a CREB, az Ets-1, a Sap1a, a Tal, az ATF-2, a TFII-I, a c-Myc, a c-Jun és az AP-1 transzkripciós faktorokat -, melyeknek végeredménye a sejtek proliferációja, differenciálódása, a sejtciklus szabályozása és a sejtek túlélése.

### 3.4.2. Az ERK 5

Az ERK 5 - más néven nagy mitogén-aktiválta protein kináz 1 – egy 115 kDa molekulásúlyú Ser/Thr kináz. Aktivációjában elsősorban stressz faktorok valamint mitogén anyagok szerepelnek az EGF mellett.<sup>167,168,169</sup> Az ERK 1/2-vel és a JNK-val ellentétben nem szükséges az ERK 5 aktiválásához a Ras aktív formája. Ismert szubsztrátja a miocita növekedési faktor 2C (MEF2C) - melyet a p38 kináz is képes aktiválni. A szívizomban és a harántcsíkolt izomban sikerült igazolni a MEK 5 expresszióját. Az ERK 5 a harántcsíkolt izomzat DNS promoter szakaszaihoz tud kapcsolódni, a MEF2 a miogén szabályozó faktor (MRF) 2-vel aktiválja az izomzat specifikus transzkripciót. Az ERK 5 működése szükséges az izomsejtek differenciálódásához. Mindez azt sugallja, hogy izomzat-specifikus kinázzal állunk szemben. Gátlásával a sejtek S-fázisba lépését sikerült megakadályozni. Szabályozza a c-jun korai gén átírását.

### 3.4.3. A JNK

A JNK a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminális aktiváló oldalt foszforilálja, szemben az ERK 1/2 COOH (karboxil csoport)-terminálison elhelyezkedő gátló foszforilációs oldalával. Stressz-

aktiválta protein kinázoknak is nevezzük őket. 3 izoformájukat különböztetjük meg, a 46 kDa molekulásúlyú JNK1-t, az 54 kDa molekulásúlyú JNK2-t és JNK3-at. Minden sejtben megtalálhatóak. A JNK3 elsősorban az idegrendszerben, a szívben és a tesztiszben mutatható ki. Aktiválhatók citokinekkal, ultraviola (UV) fényvel, ischemiában, receptor tirozin kinázok hatására, DNS károsító anyagokkal valamint G-protein kapcsolt receptorokkal és növekedési faktorokkal.<sup>161,170</sup> Aktiválásához kettős foszforilációra van szükség, mely a konzervált Thr-Pro-Tyr szakaszon történik a MEK4 és MEK7 MKK-ok által.

Számos sejtfunciót szabályoznak a transzkripciós faktorokra kifejtett hatásukon keresztül. Foszforilálják többek között az ATF-2, az N-ATc1, az NFAT, a GATA4, az Elk-1, a MEF-2, a p53, a DPC4, a HSF-1 és a c-Jun transzkripciós faktorokat. A stimuláló faktor függvényében különböző transzkripciós faktorok más-más válaszokat váltanak ki. Számos hormon, citokin – így az Ang is – hipertrófiát indukál simaizom sejtekben, szívizom sejtekben. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal szintén a JNK hipertrófiában betöltött szerepét sikerült igazolni, míg ultraibolya sugárzással a JNK apoptózisban betöltött szerepére sikerült rámutatni.<sup>171</sup>

A JNK szerepét eddigi az apoptózisban, a sejtek növekedésében, proliferációjában a sejtek differenciálódásában, a migrációban, az exocitózisban, a sejtek stresszre adott válaszába, a sejtek túlélésében igazolták.

#### 3.4.4. A p38 kináz

A p38 kináz molekulásúlya 38 kDa. 4 izoformáját ismerjük, a p38 $\alpha$  kinázt, a p38 $\beta$  kinázt, a p38 $\gamma$  kinázt és a p38 $\delta$  kinázt. A aktiválódó MAPK-ok foszforilálásáért a MKK3 és a MKK6 felelősek. E két p38 kinázra specifikus MKK mellett a MKK4-es a JNK mellett a p38 kinázt is képes aktiválni, ami magyarázhatja a két kináz szerepét hasonló folyamatokban. A Thr- Glycin (Gly)-Tyr szakasz kettős foszforilációja vezet a p38 kinázok aktiválásához. A p38 $\alpha$  kináz aminosav szekvenciája 50%-ban azonos az ERK 2-vel.<sup>172</sup>

A p38 kináz foszforilálódik oxidatív stressz, UV besugárzás, hipoxia, ischaemia, citokinek (pl. IL-1, TNF- $\alpha$ ) hatására. Ezen stimulusok szabad gyökökön keresztül valamint G-proteinek (Cdc42, Rac1) aktiválásán át a p21 aktivált kináz (PAK) segítségével vezetnek a p38 kináz foszforilációhoz. A p38 kináz szerepének fontosságára sikerült rámutatni, a monociták IL-1 és TNF- $\alpha$  termelésében, a T-sejtek IL-2 termelésében. A p38 kináz



gátlásával sikerült megakadályozni a sejtek növekedését. Az apoptózisban is részt vesz a mellett, hogy működése fontos a neonatális szívizom sejtek proliferációjában, a trombociták aggregációjában, immunológiai és gyulladásos folyamatokban, az adhézióban, granulomok exocitózisában valamint sejtek migrációjában. Ang hatására szintén sikerült kimutatni foszforilálódását.

Az aktív p38 kináz szubsztrátjai a PLA-2, a mikrotubulusok asszociált Tau fehérje, a MAPKAP kináz 2 valamint az ATF-1 és -2, a MEF2A, a Sap-1, az Elk-1, az NF- $\kappa$ B, az Ets-1, a p53, az NFAT, a CREB transzkripciós faktorok.

A fent felsorolt és részletezett kinázok működését foszfatázok is szabályozzák, melyek feladata inaktiválásukban van, azonban pontos működésük, annak szabályozása alig ismert. A kettős specificitású foszfatázokat (DUSP) jelenleg 3 csoportba sorolják. A DUSP-1, -2 és -4 a JNK-t és a p38 kinázt inaktiválja, a DUSP-5, -6, -7,-9 az ERK-et, a DUSP-8, -10, -16 pedig szintén a JNK és a p38 kináz inaktiválásáért felelős.<sup>173</sup>

#### 4. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk a kardiovaszkuláris rendszert és a vesét érintő rizikófaktorok és a szabad gyökök patofiziológiában betöltött szerepének vizsgálata volt in vitro és in vivo rendszerekben.

- Vörösvértestekben vizsgáltuk a MG és a vas hatását a szabadgyök-képzésre és a kalcium akkumulációra.
- Vizsgáltuk a MG interakcióját az argininnel, valamint a vas jelenlétének hatását e reakcióra.
- Vizsgáltuk a vas és a MG között létrejövő redox reakciót.
- Vizsgáltuk a dohányfüst és egy lehetséges komponense, a formaldehid hatását in vitro rendszerben a bradikinin kiváltotta kalcium beáramlásra.
- In vitro modellben tanulmányoztuk az aldosteron MAP kinázokra gyakorolt hatását és a szabad gyökök szerepét.
- Vizsgáltuk az aldosteron hatását az angiotenzin II kiváltotta MAP kináz aktiválásra.
- Vizsgáltuk, hogy a spironolakton képes-e befolyásolni az angiotenzin II MAP kinázokra kifejtett hatását, valamint az Ang II indukálta szabadgyök-termelést.
- Vizsgáltuk humán reninre és humán angiotenzinogénre kettős transzgenikus patkányban az eplerenon hatását a vérnyomásra, a szívizomműködésre, a szívizom hipertrófiára, az albuminuriára és a nefroszklerózisra.
- Vizsgáltuk a hőkezelt, magas fehérjetartalmú ételek szérum-AGE-szintre, vizelet-AGE-kiválasztásra és a veseműködésre kifejtett hatását egészséges önkéntesekben.

## 5. MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK

### 5.1. Az MG és vas hatása a szabadgyök-képződésre és az ionizált kalcium intracelluláris koncentrációjára izolált humán vörösvértestekben

Vizsgálatainkkal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MG képes-e szabad gyökök termelését indukálni vörösvértestekben. Az intracelluláris szabadgyök-képződést fluoreszcens módszerrel, dichlorofluoresceinnel (DCF) mutattuk ki. A vvt-kben vizsgáltuk az intracelluláris, alacsony mólsúlyú SH-vegyületek szintjének alakulását, amiből szintén az oxidatív stressz mértékére tudunk következtetni.

Szintén vizsgálataink tárgyát képezte az ionizált intracelluláris kalciumszint változása vvt-kben MG és  $\text{Fe}^{2+}$  hatására. Vvt-kben végzett kísérleteken vizsgáltuk a  $\text{Fe}^{2+}$  és az MG együttes hatását, és a szabadgyök-fogó vegyületek lehetséges szerepét a károsító hatás kivédésében.

#### 5.1.1. Módszerek

Egészséges önkéntesektől - írásos beleegyezési nyilatkozat aláírását követően - vacutainer rendszerben vettünk vért, heparint tartalmazó csövekbe. A mintákat 2400 g-vel centrifugáltuk 5 percig. Eltávolítottuk a plazmát és a buffy coat-ot, a vvt üledéket, pedig háromszor mostuk 7,4-es pH-jú, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM hidroxietil-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) és 5 mM glukóz tartalmú pufferben. A mosott vvt-eket 7,4-es pH-jú, 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 60 mM HEPES és 5 mM glukóz tartalmú pufferben reszuszpendáltuk. A mosott vvt-szuszpenzió hematokritját sejtszámláló segítségével 0,1%-ra állítottuk be. A vvt-eket dichlorofluorescein diacetáttal (DCF-DA; 5  $\mu\text{M}$ , 20 perc) és Fura-2-AM-mel (1  $\mu\text{M}$ , 30 perc) inkubáltuk. A DCF fluoreszcenciáját 504 nm excitációs és 526 nm emissziós hullámhosszon mértük.<sup>174</sup> A szabad, ionizált kalcium intracelluláris koncentrációját Fura-2-AM segítségével, a Grynkiewicz és mts-ai által leírtak szerint határoztuk meg.<sup>175</sup> A Fura-2-AM fluoreszcenciáját, mely 510 nm emissziós hullámhossznál detektálható, egyrészt 340 nm, másrészt 380 nm excitációs hullámhossz mellett mértük. E két hullámhosszon mért két érték hányadosával arányos az intracelluláris kalcium koncentráció (340/380 nm). A méréseket Hitachi F-4500 fluoreszcens spektrofluoriméterrel (Hitachi, Tokyo, Japán), 37°C-on végeztük. A vvt ülepedésének megelőzésére folyamatos, alacsony sebességű

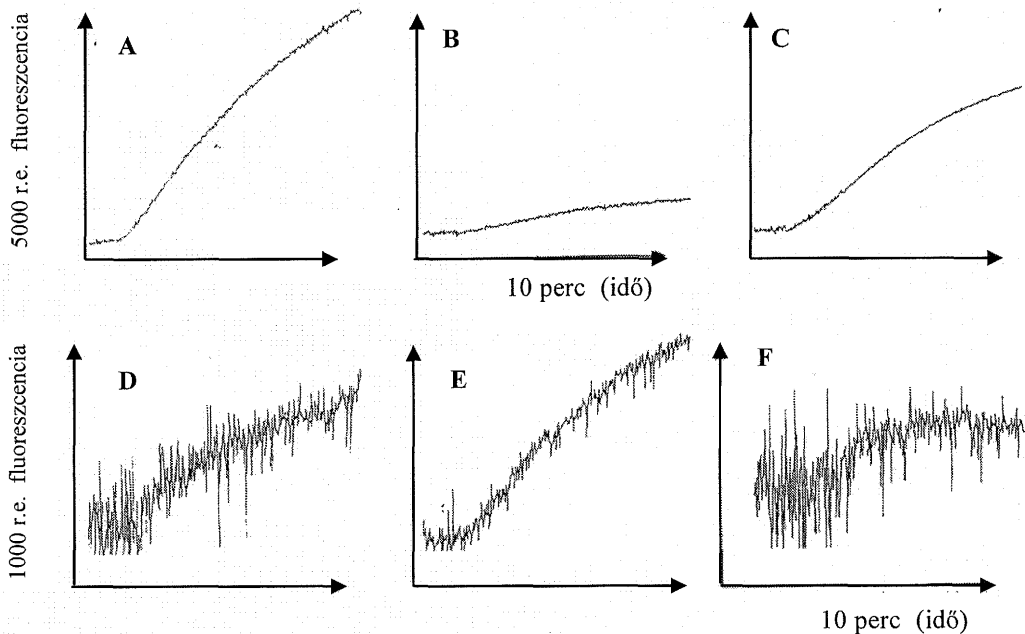
automatakeverést alkalmaztunk. A fluoriméter vezérléséhez a Multi-Wavelength Time Scan System (Hitachi, Tokyo, Japán) programot használtuk.

A vvt-szuszenzió DCF és fura-2 eredetű fluoreszcenciáját 10 percig rögzítettük. A mérés elején antioxidánst adtunk a vvt-szuszenzióhoz. A következő antioxidánsok végkoncentrációit alkalmaztuk: SOD, 200 NE/ml; kataláz, 2000 NE/ml; trolox (E-vitamin analóg, lipid peroxidáció gátló), 0,1 mM; deferrioxamin (mely a  $\text{Fe}^{2+}$ -t  $\text{Fe}^{3+}$ -má oxidálja, és a ferri ion megkötésével meggátolja a vas redox ciklusát), 1 mM; GSH, 5 mM. A kataláz és a fura-2 kivételével a méréseket nem zavarta a szabadgyök-fogó és a fluoreszcens indikátor interakciója. A fentiek miatt a kataláz  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra kifejtett hatása nem volt vizsgálható. A mérés első percének végén  $\text{Fe}^{2+}$ -t (pozitív kontroll) vagy MG-t injektáltunk a küvettába. Eredményeinket 6 független mérésből számolt, átlag  $\pm$  SD formájában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez a Student-féle kétmintás t-tesztet használtuk.

Az intracelluláris alacsony mólsúlyú SH csoport méréséhez fluoreszcens módszert használtunk orto-phthalaldehiddel (OPA) történő derivatizálást követően.<sup>176</sup> 1%-os vvt suszenziót 1 mM MG-vel inkubáltunk szobahőmérsékleten 5, 10, 15, 20, 25 és 30 percig. Centrifugálást követően az MG-vel kezelt és a kontroll vvt-eket 6%-os perklórsavban vettük fel, majd 10 perces, 4000 g-vel történt centrifugálás után a felülúszót 5 M-os  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -mal semlegesítettük, és 1 M-os, 8-as pH-jú tris-hidroximetil-aminometán (TRIS) pufferrel hígítottuk. Az így nyert minta fluoreszcenciáját 340 nm-es excitációs és 425 nm-es emissziós hullámhosszon mértük 10 mg/ml metanos OPA oldat hozzáadása előtt és után. A kiindulási és a 60 másodpercnél mért értékek különbségét GSH standardok megfelelő értékeivel vetettük össze (3,125 - 25  $\mu\text{M}$ ). Eredményeinket a kontroll százalékában, három független mérésből számolt átlag  $\pm$  SEM formájában adtuk meg. A statisztikai vizsgálathoz a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk.

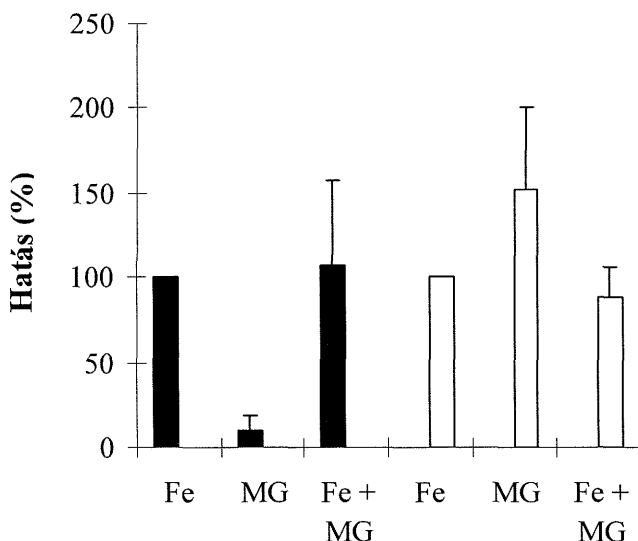
### 5.1.2. Eredmények

A 4. ábrán látható, hogy mind a  $\text{Fe}^{2+}$  (A, 100  $\mu\text{M}$ ), mind az MG (B, 1 mM) hatására nő a szabad gyökök képződése (DCF fluoreszcenciájának fokozódása), mely az oxidatív stresszt jelzi. Az ionizált kalcium intracelluláris koncentrációja a vvt-kben, mind  $\text{Fe}^{2+}$  (D), mind pedig MG hatására (E) megemelkedett.

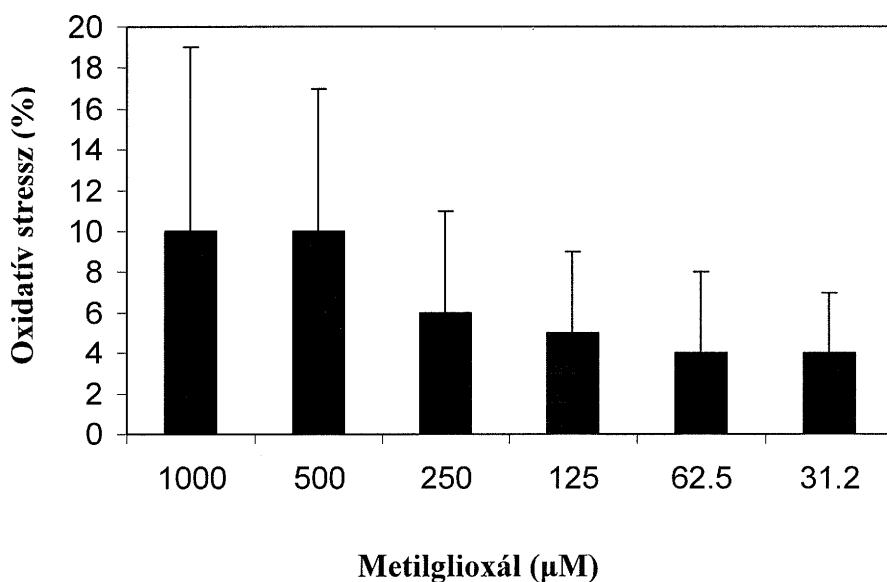


**4. ábra** A szabadgyök-szint és az intracelluláris kalcium szint változása az idő függvényében  $Fe^{2+}$  és metilglioxál hatására vörösvértestekben. A  $Fe^{2+}$  (A), a metilglioxál (B), valamint a  $Fe^{2+}$  és a metilglioxál (C) együttes hatására nő a szabadgyök-képződés és az intracelluláris kalcium szint (D:  $Fe^{2+}$ , E: metilglioxál, F:  $Fe^{2+}$  és metilglioxál).

A  $Fe^{2+}$  MG-vel történő együttes inkubációjával, vvt szuszpenzióban, nem fokozta a diklorofluorescein fluoreszcenciáját a  $Fe^{2+}$ -höz viszonyítva. Az MG-kiváltotta  $[Ca^{2+}]_i$  növekedéshez viszonyítva a  $Fe^{2+}$ -vel történő együttes inkubáció kisebb  $[Ca^{2+}]_i$ -szint-változást okozott, ami megegyezett a  $Fe^{2+}$  kiváltotta  $[Ca^{2+}]_i$ -szint-változással (5. ábra).



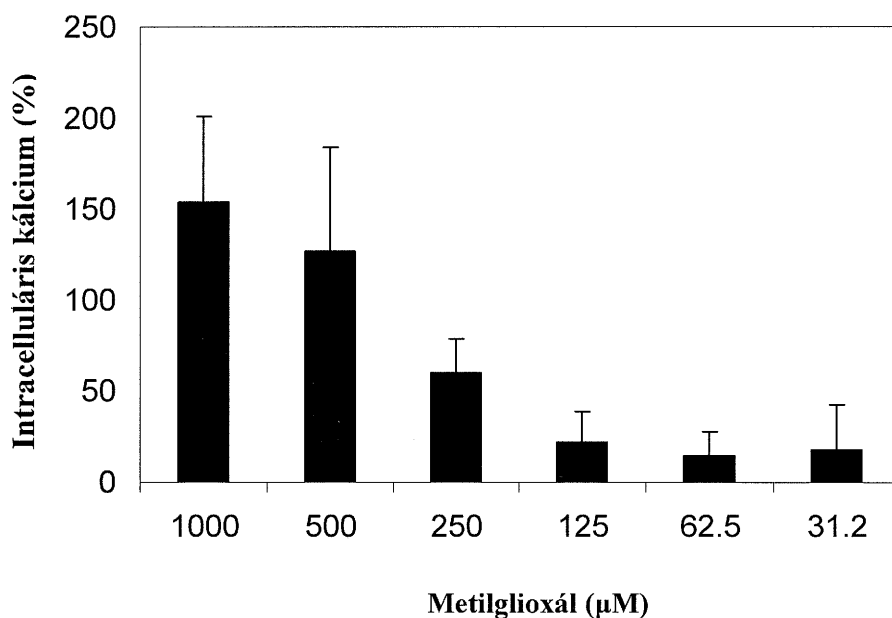
**5. ábra.** A szabadgyök-szint (■) és az intracelluláris kalcium szint (□) változása az idő függvényében  $Fe^{2+}$  és metilglioxál hatására vörösvértestekben,  $100 \mu M Fe^{2+}$  hatását 100%-nak véve.



**6. ábra** A metilglioxál koncentrációfüggő hatása a vörösvértestek szabadgyök-képződésére.

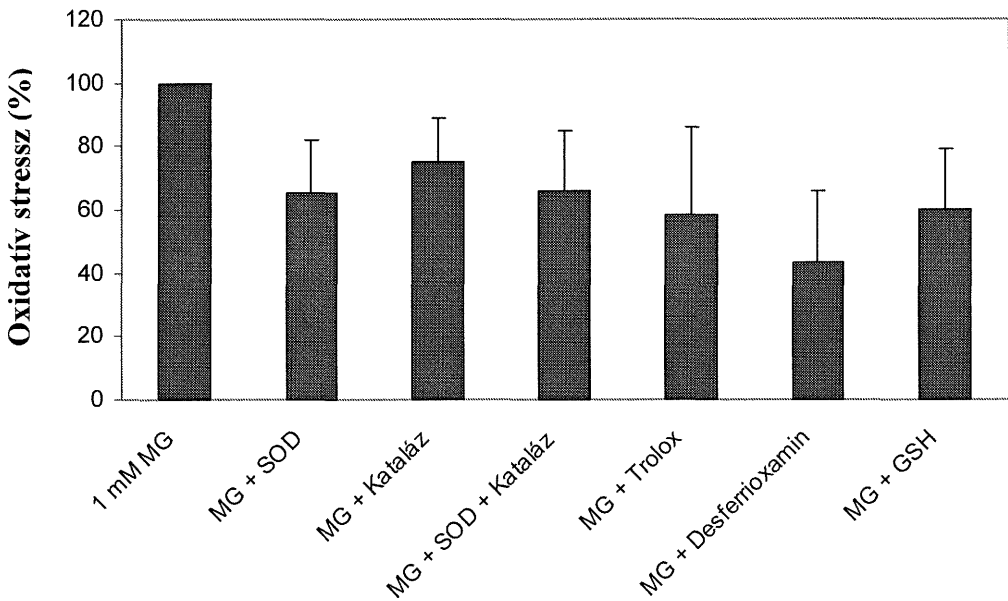
Az MG az izolált vvt-kben koncentrációfüggően fokozta a szabadgyök-képződést (6. ábra) és az ionizált kalcium intracelluláris koncentrációját (7. ábra).

Az 6. ábrán a pozitív kontrollként használt 100 µM-os koncentrációjú  $\text{Fe}^{2+}$  hatását vettük 100%-nak.



**7. ábra** A metilglioxál koncentrációfüggő hatása a vörösvértestek intracelluláris kalcium szintjére.

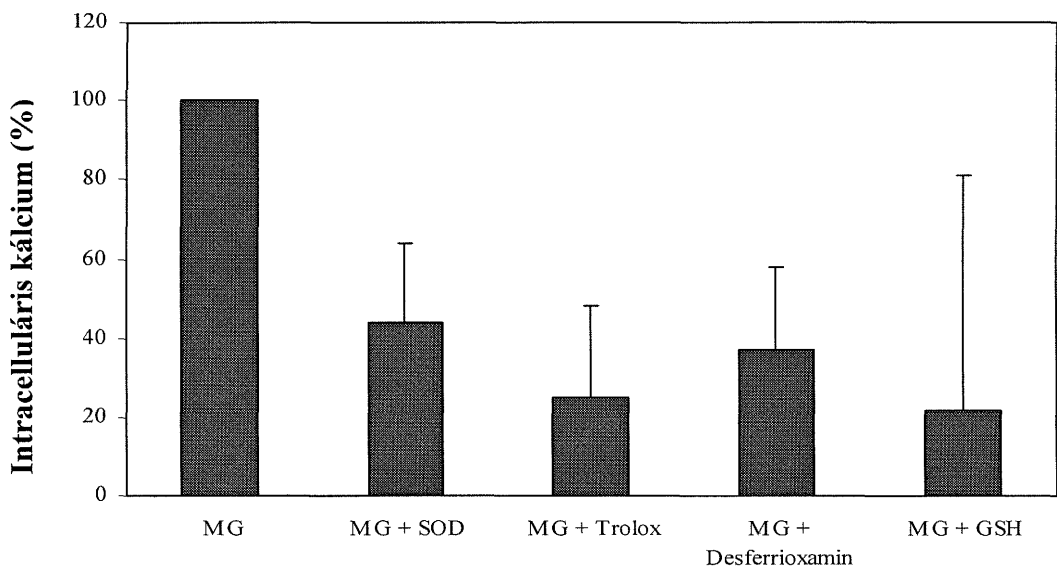
Az általunk használt antioxidánsok és a desferrioxamin szignifikánsan csökkentette az MG által kiváltott szabadgyök-képződést (8. ábra) és az intracelluláris kalcium akkumulációt (9. ábra).



**8. ábra** Scavangerek és a desferrioxamin hatása a metilglioxál kiváltotta szabadgyök-képződésre vörösvörtestekben.

Nem volt értékelhető a kataláz intracelluláris kalcium szint-változására kifejtett hatása, mivel a kataláz önmagában is befolyásolta a fura-2 fluoreszcenciáját.

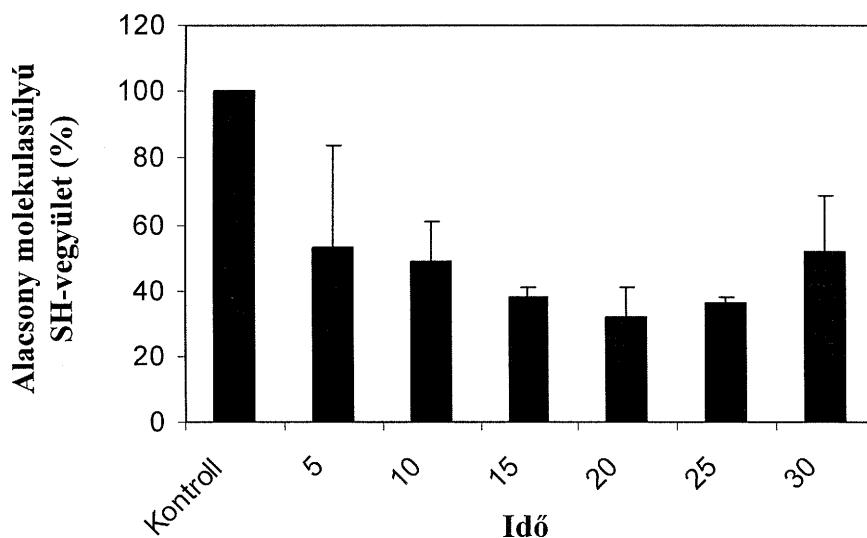
Az intracelluláris, alacsony molekulásúlyú SH-vegyületek szintje az MG-vel történő 5-30 perces inkubációk hatására a kiindulási értékhez képest 46-66%-kal csökkent (10. ábra). Az SH-csoport-fogyás mértéke a 10 és a 30 perc közötti inkubációs idők esetén volt szignifikáns ( $p < 0,05$ ).



**9. ábra** Scavangerek és a desferrioxamin hatása a metilglioxál kiváltotta intracelluláris kalcium szintre vörösvörtestekben.

### 5.1.3. Összefoglalás

Az MG izolált humán vörösvértestekben fokozza a szabadgyök-képződést, és az intracelluláris kalcium akkumulációjához vezet. Ezen hatások antioxidánsok segítségével kivédhetők voltak. Az MG a vvt-kben az alacsony molekulásúlyú SH-vegyületek fogyásához vezet.



**10. ábra** A metilglioxál hatása az alacsony molekulásúlyú thiol-vegyületek szintjére vörösvértestekben.

### 5.2. A vas hatása az MG és az arginin inkubációjából származó szabad gyökökre

Mind a glikáció, mind a glikáció során keletkezett intermedierek – pl. a reaktív aldehidek – hatására szabad gyökök keletkeznek. MG képződik enzimatis úton, valamint a nem enzimatis glikáció során is. Az MG reaktív aldehidként a glikációs intermedierek közé tartozik. Az arginin glikációja során az MG által keltett szabad gyököket ESR vizsgálattal elemeztük. Megvizsgáltuk a szabadgyök-képződésben fontos szerepet játszó vas hatását az arginin + MG reakcióra.

#### 5.2.1. Módszerek

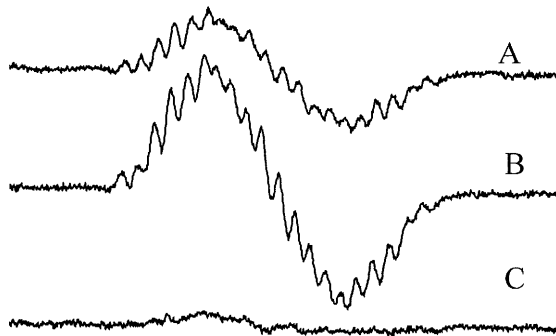
Az arginint és az MG-t (mindkettő végkoncentrációja 0.5 M volt) 100 mM foszfát pufferben oldottuk. A vas katalizáló hatásának vizsgálatához 0,62 - 10 mM végkoncentrációban adtunk  $\text{Fe}^{3+}$ -t vagy  $\text{Fe}^{2+}$ -t az arginint és MG-t tartalmazó oldathoz. A



vas specifikus hatásának bizonyításához desferrioxamint (redox ciklust gátló, irreverzibilis  $\text{Fe}^{3+}$  kelátor, 10 mM) és ferrozint (redox ciklust gátló, irreverzibilis  $\text{Fe}^{2+}$  kelátor, 40 mM) használtunk. Az ESR méréseket 8,5-ös pH-n végeztük (7.5-es pH-n sokkal gyengébb jel volt detektálható). Az ESR készülék (Bruker ESP 300 E, Bruker, Billerica, MA) beállításai a következők voltak: mikrohullámú teljesítmény: 20 mW, modulációs amplitúdó: 0,2 G, scan szélesség: 100 G. Az ESR jel kettős integráljának segítségével határoztuk meg a szabad gyökök koncentrációját. Standard mintaként 10  $\mu\text{M}$ -os maleinimid vizes oldata szolgált.

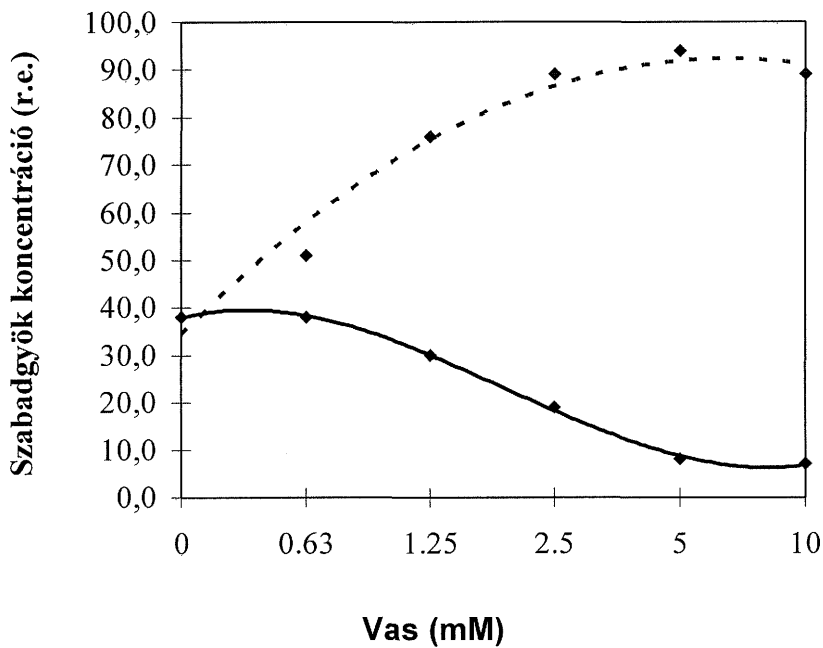
### 5.2.2. Eredmények

Az arginin és az MG reakciója során olyan ESR-spektrum keletkezhet, mely a Yim és mts.-i által az L-alanin vizsgálata kapcsán leírt gyökre hasonlít (11. ábra, A).<sup>177</sup> A  $\text{Fe}^{3+}$  növelte (11. ábra, B) a  $\text{Fe}^{2+}$  pedig csökkentette (11. ábra, C) az ESR-jel intenzitását.



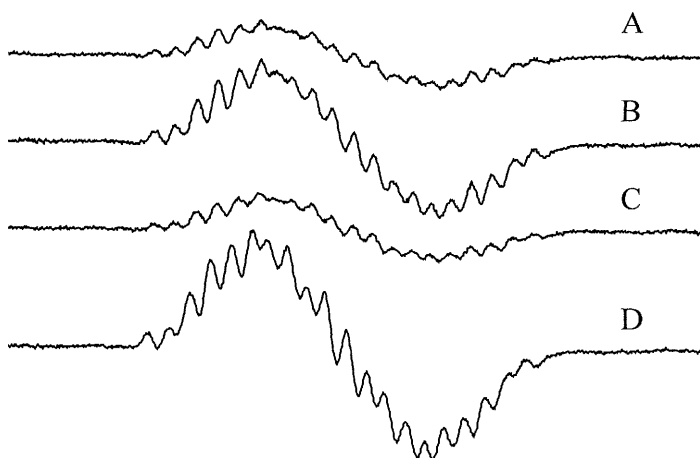
**11. ábra** A  $\text{Fe}^{3+}$  növeli (B), a  $\text{Fe}^{2+}$  pedig csökkenti (C) az arginin és a metilglioxál reakciója során keletkező ESR jelet.

A  $\text{Fe}^{3+}$  koncentrációfüggően fokozta, a  $\text{Fe}^{2+}$  pedig koncentrációfüggően gátolta a szabadgyök-képződést (12. ábra).

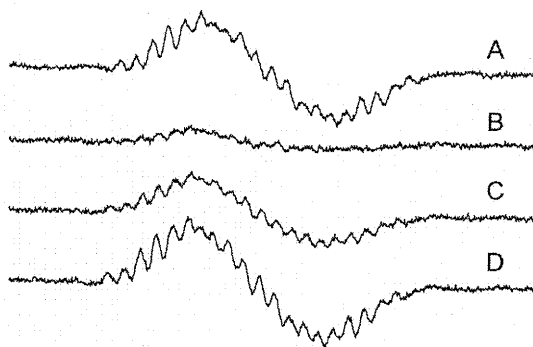


**12. ábra** A  $Fe^{2+}$  ( — ) és a  $Fe^{3+}$  ( ..... ) koncentrációfüggő hatása a szabadgyök-koncentrációra.

Mind a  $Fe^{2+}$ , mind a  $Fe^{3+}$  esetében az 5 mM-os ionkoncentráció a 10 mM-ossal megegyező effektivitású volt. Kísérletünkben a  $Fe^{3+}$  szabadgyök-képződést fokozó hatása desferrioxaminnal (13. ábra), a  $Fe^{2+}$  szabadgyök-képződést gátló hatása ferrozinnal volt kivédhető, az MG-t és arginint tartalmazó rendszerben (14. ábra).



**13. ábra** A  $Fe^{3+}$  és vas-kelátorok hatása a metilglioxál és arginin kiváltotta ESR-jelre. A: metilglioxál+arginin, B: A+  $Fe^{3+}$ , C: B+desferrioxamin, D: B+ferrozin.



**14. ábra** Az  $Fe^{2+}$  és vas-kelátorok hatása a metilglioxál és L-arginin kiváltotta ESR-jelre. A: metilglioxál+L-arginin, B: A+  $Fe^{2+}$ , C: B+desferrioxamin, D: B+ferrozin.

### 5.2.3. Összefoglalás

Az MG és az arginin reakciója során kialakuló keresztkötésben elhelyezkedő kation szabad gyök képződését a  $Fe^{3+}$  fokozta, a  $Fe^{2+}$  pedig gátolta.

### 5.3. Az MG hatására bekövetkező vasredukció

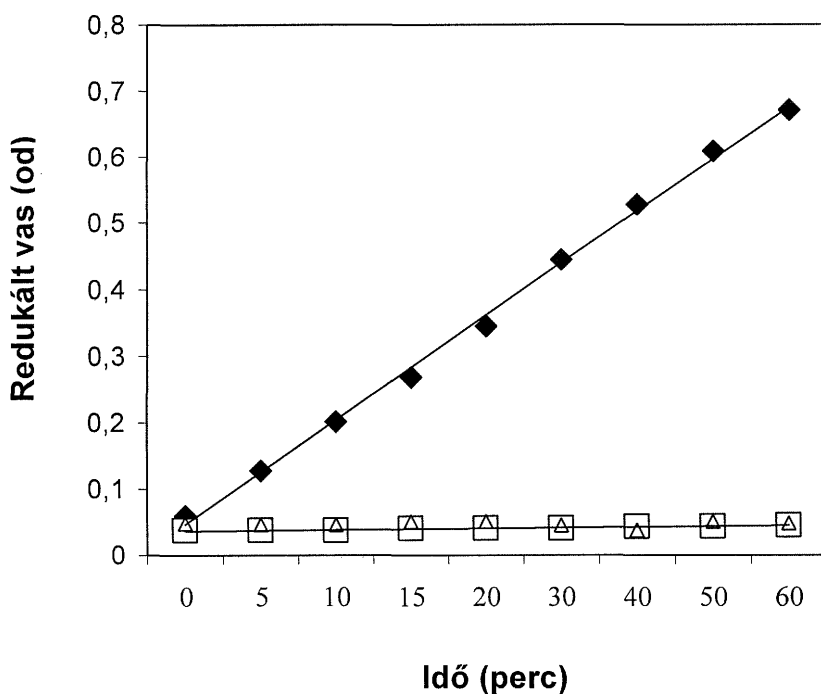
Az 5.2.2. fejezet eredményei alapján az MG reakcióba léphet a  $Fe^{3+}$ -mal, hiszen az MG által kiváltott szabadgyök-képződést a  $Fe^{3+}$  fokozta. Egy lehetséges reakció az MG és a  $Fe^{3+}$  között, a  $Fe^{3+}$  MG hatására bekövetkező redukciója. Ennek bizonyítására ferrozin felhasználásával spektrofotometriás módszert alkalmaztunk.

#### 5.3.1. Módszerek

A  $Fe^{2+}$ , mely a  $Fe^{3+}$  redukciójából keletkezhet, ferrozinnal komplexet képez. A  $Fe^{2+}$ -ferrozin komplex abszorpciós maximuma 561 nm-nél detektálható. Vizsgálatunkban 100  $\mu$ M  $Fe^{3+}$ -t és 1 mM ferrozint tartalmazó oldathoz 1 mM MG-t adtunk és 60 percen keresztül mértük az abszorpciót 561 nm-nél egy Hitachi 2001 spektrofotométerrel (Hitachi, Tokyo, Japán). A mérést a  $Fe^{3+}$  redukcióját gátló desferrioxamin jelenlétében is elvégeztük. Kontrollként az MG-t nem tartalmazó oldat szolgált.

### 5.3.2. Eredmények

A 15. ábrán látható az MG hatására bekövetkező vas redukció, mely desferrioxaminnal gátolható. Az MG-t nem tartalmazó oldatban nem jött létre vas redukció.



15. ábra A metilglioxál időfüggő módon redukálja a  $Fe^{3+}$ -t. ◆:  $Fe^{3+}$  + metilglioxál, □:  $Fe^{3+}$  metilglioxál nélkül, △:  $Fe^{3+}$  + metilglioxál + desferrioxamin.

### 5.3.3. Összefoglalás

A metilglioxál hatására a  $Fe^{3+}$   $Fe^{2+}$ -vé redukálódik.

### 5.4. Az MG + arginin reakció termékének abszorpciós spektruma

Az 5.2. fejezetben tárgyalt ESR vizsgálataink alapján a  $Fe^{3+}$  és a  $Fe^{2+}$  ion különbözőképpen befolyásolja a szabadgyök-képződést az arginin + MG reakcióban. A fentiek alapján felmerült, hogy a kétféle vasion eltérő termékek képződésének irányába tereli a reakciót. A kérdés megválaszolására az arginin + MG reakcióban a  $Fe^{3+}$  illetve a  $Fe^{2+}$  jelenlétében képződő termékek abszorpciós spektrumát vetettük össze.

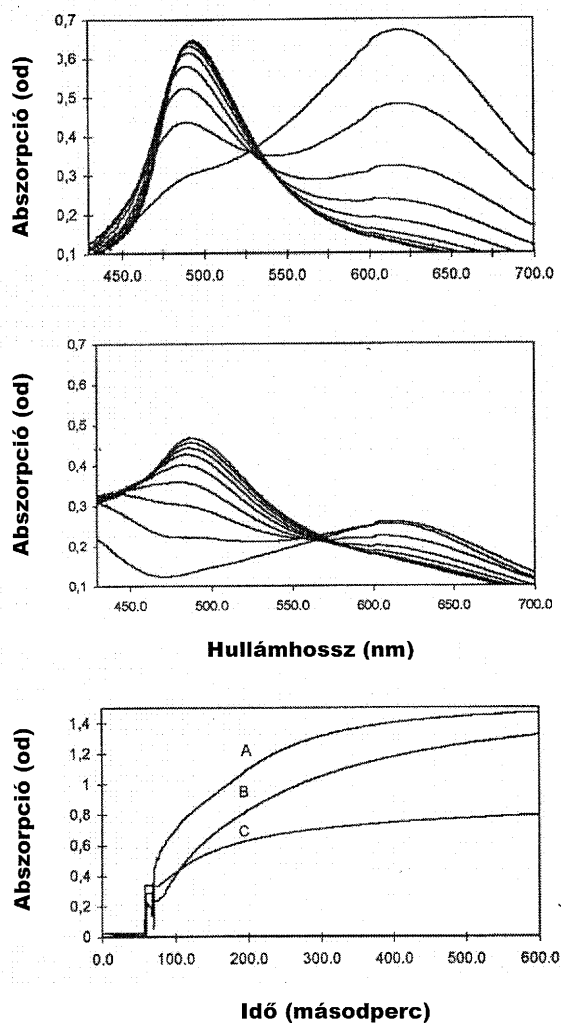
#### 5.4.1. Módszerek

Az arginin és az MG reakciójából származó - barna színt adó - termék abszorpciós spektrumát a látható hullámhossztartományban mértük  $\text{Fe}^{2+}$  illetve  $\text{Fe}^{3+}$  jelenlétében Hitachi 2001 spektrofotométerrel (Hitachi, Tokyo, Japán), vas ionokat nem tartalmazó „vak” oldattal szemben. A spektrum felvételét percenként ismételtük. A vas ionok végkoncentrációja 10 mM volt.

A 490 nm-nél detektálható színreakció időbeli lefutását 10 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , vagy  $\text{Fe}^{3+}$  jelenlétében, illetve vas iont nem tartalmazó oldatban folyamatos mérésrel is detektáltuk. Itt „vakként” a csak arginint tartalmazó minta szolgált.

#### 5.4.2. Eredmények

Mind a  $\text{Fe}^{2+}$  (16. ábra, felső panel) mind a  $\text{Fe}^{3+}$  esetében (16. ábra, középső panel) a 630 nm-nél található csúcs csökkenését és a 490 nm-nél található csúcs növekedését láthattuk. A reakció időbeli lefutásának vizsgálata alapján a  $\text{Fe}^{2+}$  hatására gyorsabban játszódik le a 490 nm-es hullámhossznál mért színreakció, mint a  $\text{Fe}^{3+}$  esetében (16. ábra, alsó panel).



**16. ábra** A vas fokozza a metilglioxált és az arginint tartalmazó rendszerben a spektrofotometriával detektált abszorpciót. **Felső panel:** A  $\text{Fe}^{2+}$  (10 mM) 490 nm-nél fokozza, 630 nm-nél csökkenti a metilglioxál és arginin kiváltotta jel intenzitását a metilglioxált és arginint tartalmazó rendszerhez viszonyítva (percenkénti mérés 10 percen keresztül). **Középső panel:** A  $\text{Fe}^{3+}$  (10 mM) 490 nm-nél fokozza, 630 nm-nél csökkenti a metilglioxál és arginin kiváltotta jel intenzitását a metilglioxált és arginint tartalmazó rendszerhez viszonyítva (percenkénti mérés 10 percen keresztül). **Alsó panel:** A metilglioxált és arginint tartalmazó rendszerben, mind a  $\text{Fe}^{2+}$  (10 mM, A), mind a  $\text{Fe}^{3+}$  (10 mM, B) fokozza a 490 nm-en detektált termék képződését az önmagában metilglioxált és arginint (C) tartalmazó rendszerhez viszonyítva argininnel szemben mérve (3 különböző mérést reprezentáló görbék).

### 5.4.3. Összefoglalás

Az arginin + MG reakció során mind  $\text{Fe}^{2+}$ , mind  $\text{Fe}^{3+}$  jelenlétében azonos abszorpciós spektrumú reakciótermék képződött, melynek abszorpciós maximuma 490 nm-nél detektálható. A  $\text{Fe}^{2+}$  a színreakciót a  $\text{Fe}^{3+}$ -nál erősebben katalizálta.

## 5.5. A dohányfüst hatása a bradikinin-kiváltotta kalciumbeáramlásra

A dohányzás szerepe ismert többek között az atherosclerosis kialakulásában. Ezen károsító hatásért a dohányfüstben jelen levő számos anyag tehető felelőssé, pl. a szabad gyökök vagy az alacsony molekulású aldehydeik. Ép viszonyok között az endothel NO-ot termel bradikinin hatására. A bradikinin a  $[Ca^{2+}]_i$  szintjének rövid ideig történő megnövelése révén a kalmodulinhoz kapcsolódva aktiválja a NOS enzimet, mely enzim felelős az NO termeléséért. Az így keletkezett NO hatására a simaizom relaxál, aminek következtében a cGMP-t termelő guanilát cikláznak köszönhetően az erek dilatálnak. A dohányfüst – és egyik összetevőjének, a formaldehidnek - hatását vizsgáltuk a  $[Ca^{2+}]_i$ -ra és a szabad gyökök szerepét a dohányfüst hatásának kivédésében.

### 5.5.1. Módszerek

Sertés aortából nyertünk endothel sejteket, tenyésztéshez.<sup>178</sup> A kollagenázzal történő emésztés után, az aortából M 199-es oldatba került sejteket, centrifugálást követően 10% fetal calf serum-ot (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazó oldatba szuszpendáltuk. A tenyésztés 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-os nedves levegőt biztosító termosztátban (Heraeus), 6 lyukú lemezen, sterilizált 1,2 cm átmérőjű üveg fedőlemezekre történt. A konfluenssé váló sejtenyészetet használtuk a további kísérletekhez.

Kereskedelmi forgalomban beszerezhető, füstszűrővel rendelkező cigaretta (Camel) füstjét dohányoztató szerkezet segítségével 5 ml, 7,4-es pH-jú Krebs oldaton buborékolattuk át 5 percig, hogy oldatban tartsuk a vízdékony dohányfüst-alkotóelemeket. Az így nyert dohányfüstpufferrel (DP) eltérő koncentrációival (DP koncentráció 6,25%-50%) és más időtartammal inkubáltuk a sejteket. A dohányfüst egyik vízdékony összetevőjével, a formaldehiddel, 30 percet inkubáltuk a sejteket 1-80 µM-os koncentrációval. A GSH (0,5-4 mM) hatásának vizsgálatához 25%-os DP-vel és 80 µM-os formaldehid pufferrel együtt inkubáltuk a nem specifikus szabad gyök fogót.

A  $[Ca^{2+}]_i$  szint méréséhez Fura-2-AM-et használtunk. Az endothellel konfluens benőtt fedőlemezeket 30 percig inkubáltuk, 1 µM Fura-2-AM-mel, 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó levegőt biztosító termosztátban. Az inkubációt követően 150 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 2,2 mM CaCl<sub>2</sub>-ot, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 5 mM glükózt és 10 mM HEPES-t tartalmazó 7,4-es pH-jú oldattal mostuk kétszer. Ezt követően a fenti oldatot tartalmazó

küvetába helyezve a sejtekkel benőtt fedőlemezt, 250 nM bradikininnel váltottuk ki a kalcium beáramlást. A mérést Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel végeztük folyamatos lassú keverés mellett, 37°C-on. Az emissziós hullámhossz 510 nm, az excitációs hullámhosszok 340 és 380 nm voltak. A  $[Ca^{2+}]_i$ -et úgy számoltuk ki, hogy a 340 nm-en mért értéket elosztottuk a 380 nm hullámhosszon mért értékkel (340/380). Öt egymástól független mérés értékét a kontroll százalékában fejeztük ki.

A sejtek GSH és thiol tartalmát OPA-val határoztuk meg fluoreszcens módszer segítségével.<sup>176</sup> A 80  $\mu$ M formaldehiddel vagy 50% DP-vel kezelt sejteket tripszin-EDTA tartalmú oldat segítségével gyűjtöttük össze a 6 wellt tartalmazó lemezen. A 2500 g-vel 5 percig centrifugált sejteket ezt követően jégen tartott 6%-os perklórsavval inkubáltuk 10 percen keresztül. 1000 g-vel 5 percig centrifugáltuk az így létrejött oldatot, ahol a felülúszó pH-ját 5 mM  $K_2CO_3$  oldattal 6 és 7 közé állítottuk be, majd a kicsapódott  $KClO_4$  eltávolítása céljából ismét 5 perc centrifugálás következett 1000 g-n. A perklórsavas extraktumot 8,1-es pH-jú, 1 M-os TRIS és 20 mM-os EDTA tartalmú oldatba vettük fel majd metanolban oldott 10 mg/ml OPA hozzáadását követően mértük a fluoreszcenciát 340 nm excitációs és 380 nm emissziós hullámhosszon. Az OPA nélküli és OPA-val mért érték különbségét hasonlítottuk a GSH standard sorhoz (0,625-10  $\mu$ M).

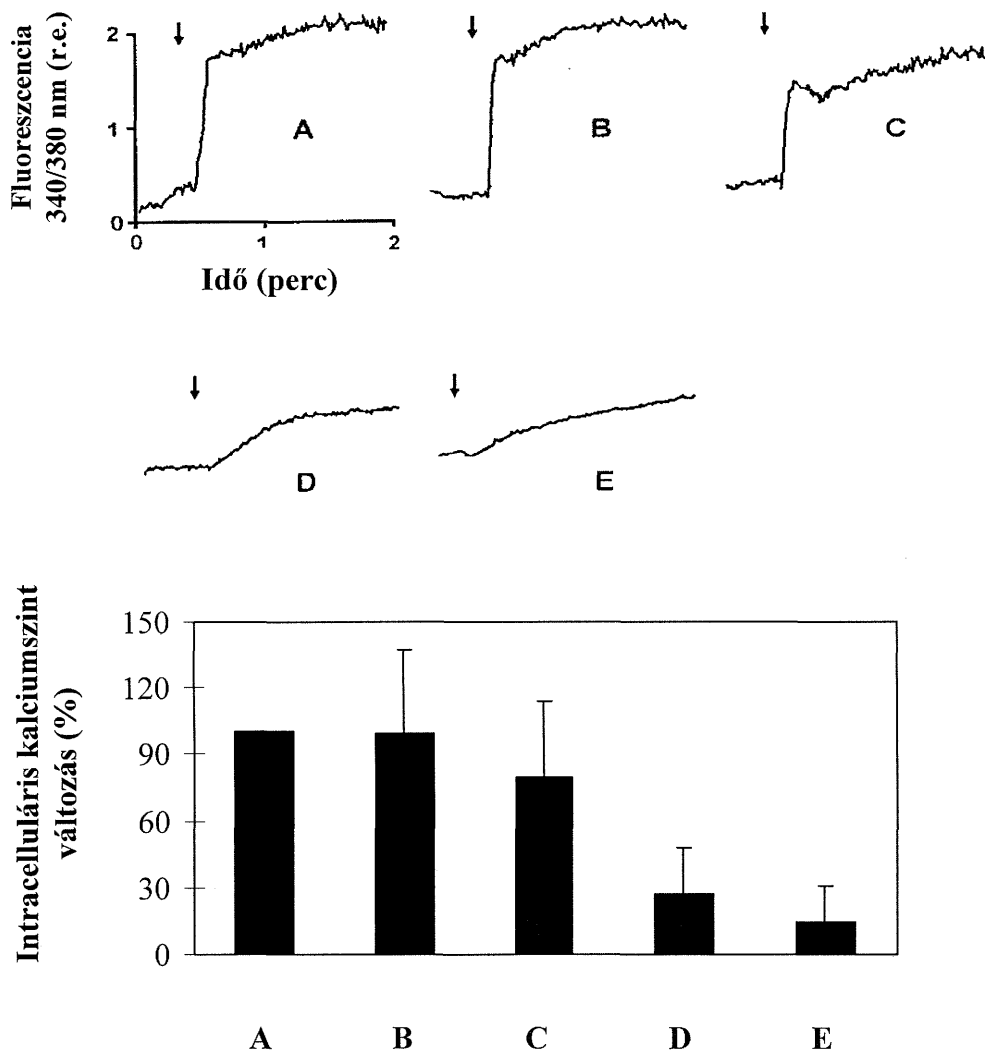
A sejtek GSH tartalmát meghatározó módszert alkalmaztuk, a sejtek thiol tartalmának meghatározására is. A perklórsavas homogenátumot 8,1-es pH-jú, 1 M TRIS-t és 20 mM EDTA-t tartalmazó oldattal mostuk. A GSH-nál használt paraméterekkel mértük a fluoreszcenciát, és az értékeket a GSH standardhoz hasonlítottuk. A fehérje tartalmat Lowry szerint határoztuk meg, a perklórsavas homogenátum üledékéből.<sup>179</sup> A 7, egymástól független GSH mérés eredményét  $\mu$ mol/g fehérjére vonatkoztatva, míg a fehérje tartalmat  $\mu$ Eq GSH/g fehérjére vonatkoztatva tüntettük fel.

Student-t próbát használva számoltuk ki a statisztikai eredményeket, SPSS program segítségével.

### 5.5.2. Eredmények

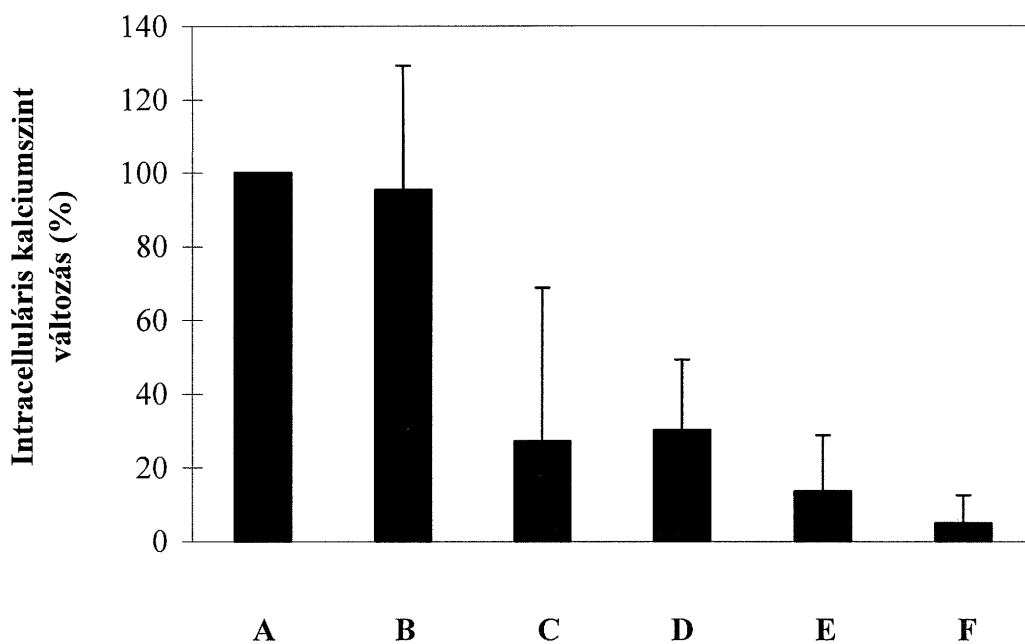
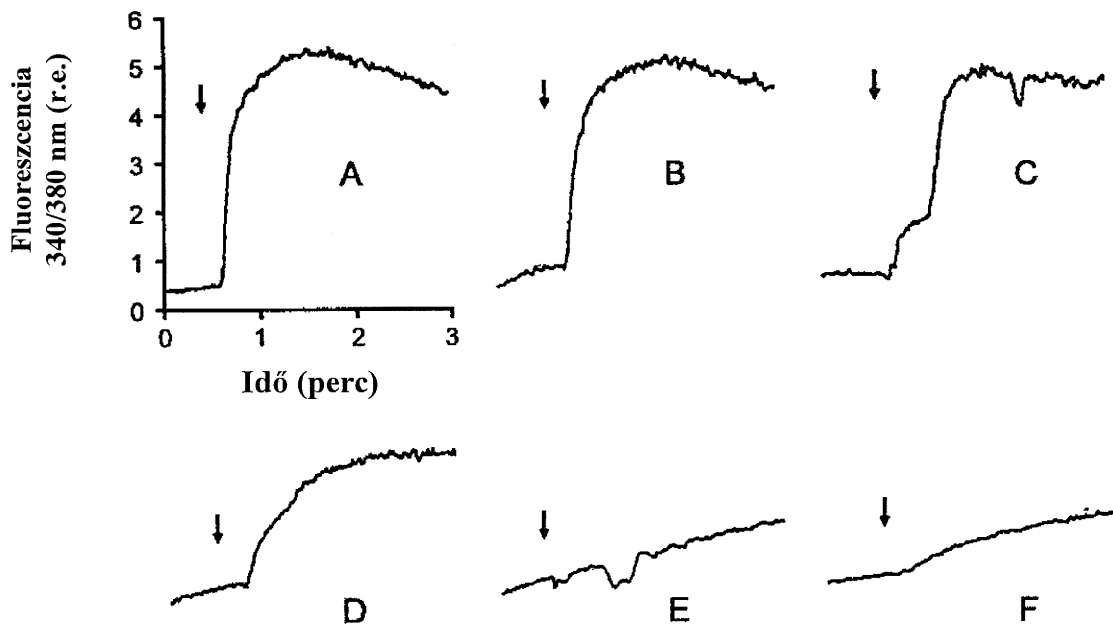
A 17. ábrán láthatjuk, hogy a DP gátolja a bradikinin-kiváltotta kalcium beáramlást. Míg a 6,25%-os és a 12,5%-os DP nem váltott ki érzéklehető kalciumszint változást, a 25%-os és az 50%-os DP hatására a kalciumbeáramlás jelentősen csökkent ( $p < 0,001$ ).





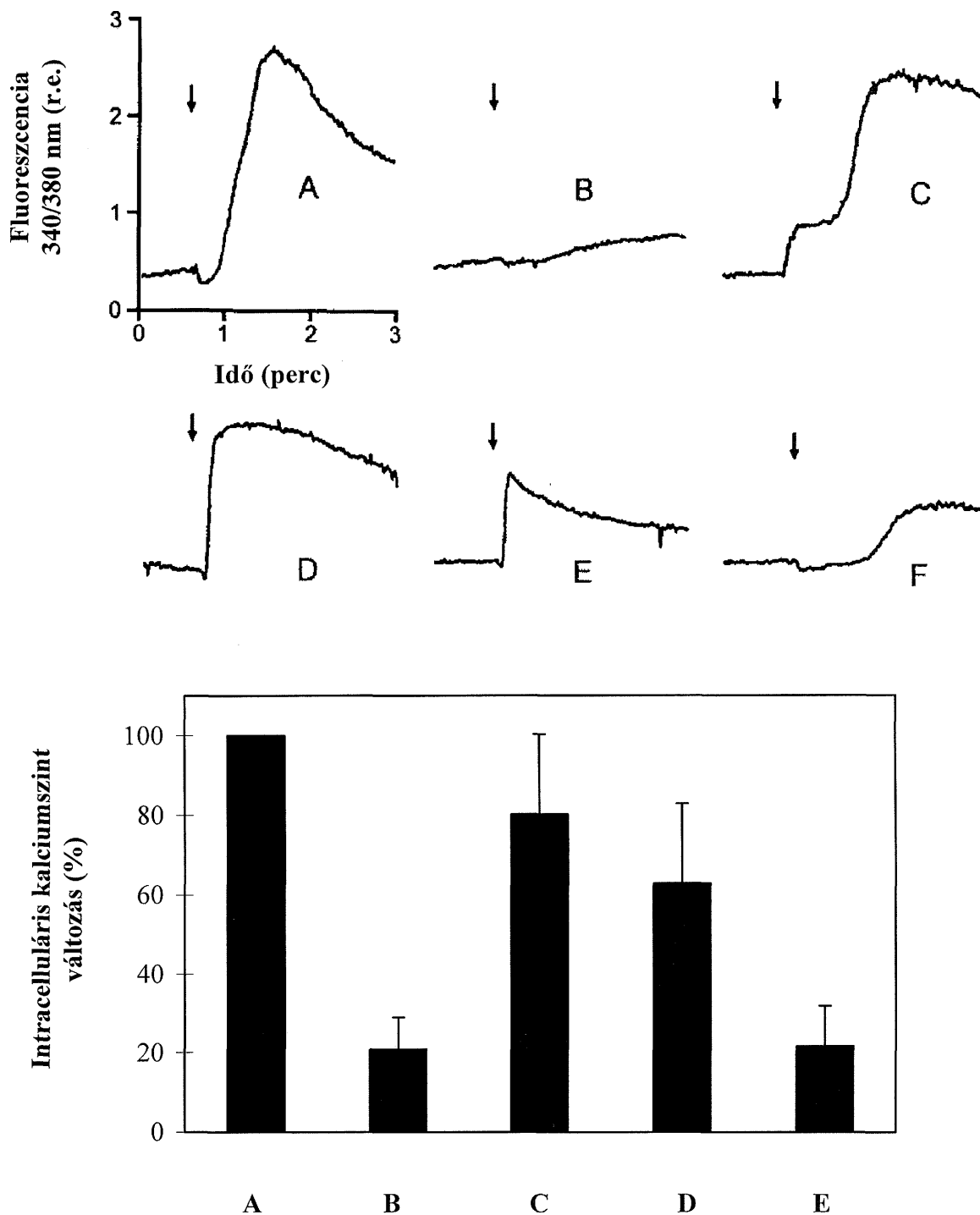
**17. ábra Felső panel:** A dohányfüstpuffer koncentrációfüggően gátolja a bradikinin-kiváltotta kalciumbeáramlást. A: kontroll, B: 6,25%, C: 12,5%, D: 25%, E: 50%-os dohányfüst puffer hígítás. A nyilak a bradikinin hozzáadásának időpontját jelzik. **Alsó panel:** a dohányfüstpuffer koncentrációfüggő hatása a bradikinin-kiváltotta kalciumbeáramlásra ( $n=5$ ,  $p<0,001$ ).

25%-os DP-el végzett inkubációval időfüggő kalciumbeáramlás-csökkenést mértünk, mely már 10 perc után szignifikáns volt ( $p<0,001$ ; 18. ábra).



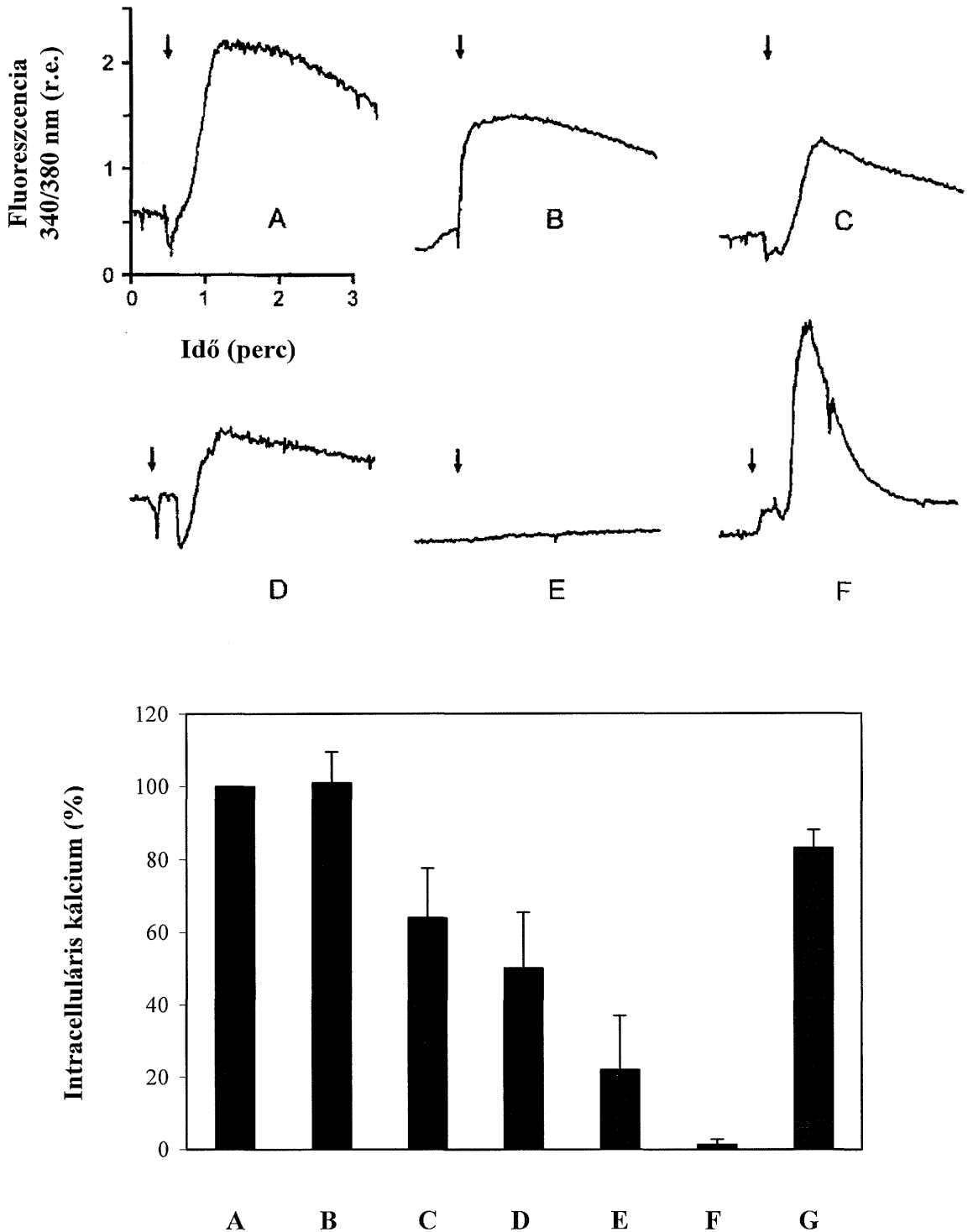
**18. ábra Felső panel:** A dohányfüstpuffer időfüggően csökkenti a bradikinin-kiváltotta intracelluláris kalciumszint-növekedést. A: kontrol, B: 5 perc, C: 10 perc, D: 20 perc, E: 30 perc, F: 40 perc. A nyilak a bradikinin hozzáadásának időpontját jelzik. **Alsó panel:** a dohányfüstpuffer időfüggő hatása a bradikinin-kiváltotta kalciumbeáramlásra ( $n=5$ ,  $p<0,001$ ).

4 mM GSH-val ( $p<0,01$ ) teljes egészében, 2 mM GSH-val ( $p<0,05$ ) részlegesen gátolható a 25%-os DP hatása a bradikinin-kiváltotta kalciumbeáramlásra. (19. ábrán)



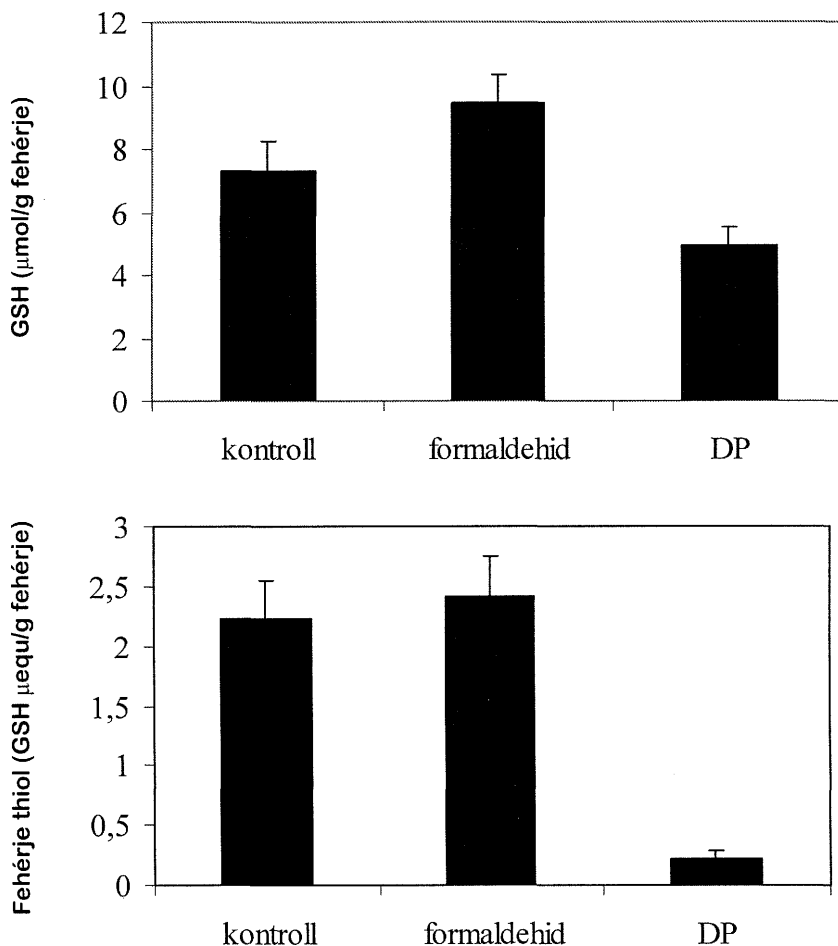
**19. ábra Felső panel:** a redukált glutation megakadályozza a dohányfüstpuffer (DP), intracelluláris kalciumszint-változásra kifejtett, károsító hatását. A: kontroll, B: 25% dohányfüstpuffer, C: 25% dohányfüstpuffer + 4 mM redukált glutation (GSH), D: 25% dohányfüstpuffer + 2 mM redukált glutation, E: 25% dohányfüstpuffer + 1 mM redukált glutation, F: 25% dohányfüstpuffer + 0,5 mM redukált glutation. A nyilak a bradikinin hozzáadásának időpontját jelzik. **Alsó panel:** a 4 mM ( $p < 0,01$ ) és a 2 mM redukált glutation ( $p < 0,05$  vs. dohányfüstpuffer,  $n = 5$ ) megakadályozza a dohányfüstpuffer, intracelluláris kalciumszint-változásra kifejtett, károsító hatását.

A bradikinin-kiváltotta kalciumbeáramlás formaldehid 10  $\mu\text{M}$ -os ( $p < 0,05$ ) vagy annál magasabb koncentrációjával koncentrációfüggő módon gátolhatónak bizonyult (20. ábra). GSH-val a 80  $\mu\text{M}$ -os formaldehid hatása kivédhető volt (20. ábra).



**20. ábra Felső panel:** a formaldehid koncentrációfüggő módon gátolja a bradikinin-kiváltotta intracelluláris kalciumszint-növekedést endothel sejtekben. A: kontroll, B:  $1 \mu\text{M}$  formaldehid, C:  $10 \mu\text{M}$  formaldehid, D:  $20 \mu\text{M}$  formaldehid, E:  $40 \mu\text{M}$  formaldehid, F:  $80 \mu\text{M}$  formaldehid. A nyilak a bradikinin hozzáadásának időpontját jelzik. **Alsó panel:** a formaldehid koncentrációfüggő módon gátolja a bradikinin-kiváltotta intracelluláris kalciumszint-növekedést. ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ,  $10\text{-}80 \mu\text{M}$  formaldehid és a kontroll viszonylatában, és a  $80 \mu\text{M}$  formaldehid +  $4 \text{ mM}$  redukált glutation (G) vs.  $80 \mu\text{M}$  formaldehid (F) esetében).

A 21. ábrán láthatjuk, hogy az 50%-os DP csökkenti a sejtek GSH és fehérje-thiol tartalmát. A formaldehidnek ilyen hatása nem volt.



**21. ábra Felső panel:** A dohányfüstpuffer (DP) csökkent és a formaldehid nem befolyásolja az endothelsejtek fehérje-thiol koncentrációját (\* $p < 0,05$  vs kontroll). **Alsó panel:** A dohányfüstpuffer csökkenti, az endothelsejtek redukált glutation (GSH) tartalmát (\* $p < 0,001$ , vs kontroll). A dohányfüstpuffer 50% hígítású, a formaldehid 80 μM-os koncentrációjú volt.

### 5.5.3. Összefoglalás

DP-vel gátolható volt a bradikinin kiváltotta kalcium beáramlás. A DP ezen hatása koncentráció és időfüggőnek bizonyult. A dohányfüst alkotóeleme, a formaldehid, szintén koncentrációfüggően gátolta a bradikinin kiváltotta kalcium beáramlást. A DP és a formaldehid hatás is kivédhetőnek bizonyult redukált glutationnal. A sejtekben a DP csökkentette mind a GSH, mind a fehérje-thiol tartalmát, a kontroll sejtekhez viszonyítva. A formaldehidnél nem volt megfigyelhető ilyen hatás.

### 5.6. Az Ald hatása simaizom sejtek ERK 1/2 és JNK foszforiláltságára

Az Ald szerepe régóta ismert a szervezet só-víz háztartásának szabályozásában, mely elsősorban az MR-eken keresztül szabályozódik. Ezzel szemben a sejtekben lejátszódó

egyéb folyamatok szabályozásában betöltött, elsősorban nem-genomikus hatása kevésbé vagy alig tisztázott. Kísérleteinkben az Ald hatását vizsgáltuk az ERK 1/2 és a JNK foszforilációjára.

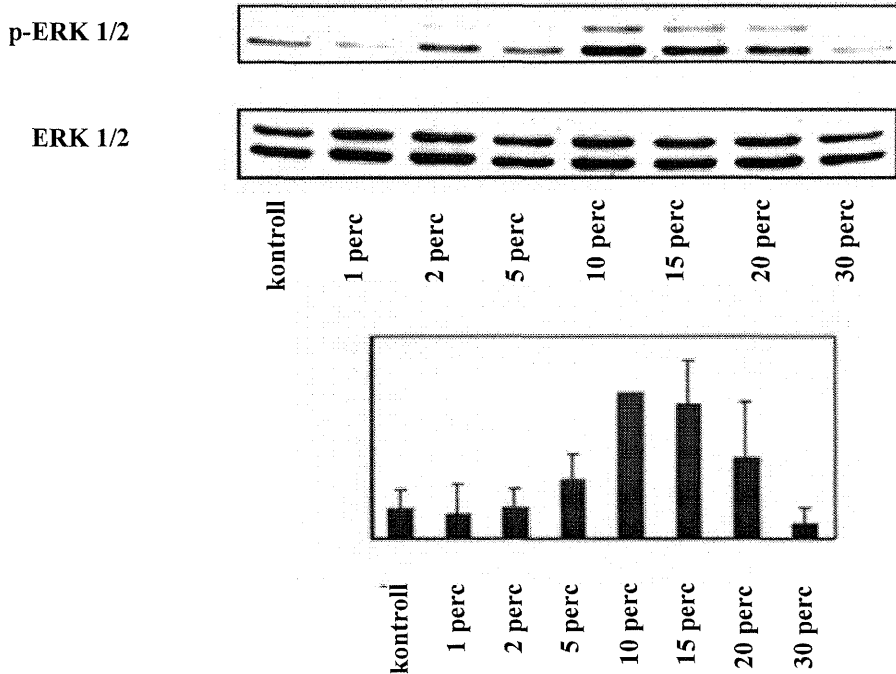
### 5.6.1. Módszerek

A simaizom sejteket Sprague-Dawley (SD) patkány aortából izoláltuk, Haller és mtsai által leírtak szerint.<sup>180</sup> A Western Blothoz használt sejtlizátumokat 4-től 10. passzázsig tenyésztett sejtek stimulációjával nyertük, amely tenyészetekben a konfluencia 80%-os volt. A sejteket inzulint, EGF-et, L-glutamint, streptomycint, penicillint és 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 tenyésztő oldatban tenyésztettük. A stimulációt megelőzően a sejteket 22 órán keresztül FCS-mentes tenyésztő oldatban tartottuk, mely oldat penicillint, streptomycint és glutamint tartalmazott. A sejteket eltérő ideig stimuláltuk Ald-dal ( $10^{-7}$  M). A stimulációt követően a tenyésztőoldatot eltávolítottuk, majd kétszer átmostuk foszfáttal pufferelt só-oldattal (PBS). Ezt követően a sejteket 0,2 M Na-O-vanadát, 0,5 M NaF, 0,1 M 3-béta-glicerofoszfát, 0,1 M nátrium-pirofoszfát, 0,2 M phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 1% foszfátáz-gátló koktél (Sigma) és 4% 2 ml-ben oldott Complete tablettát tartalmazó „radio-immunoprecipitation assay” (RIPA) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% nátrium-dezoxi-kolát, 0,1% nátrium-dodecilszulfát) pufferben kapartuk fel a 6 cm-es tenyésztő csészéből. A sejteket tartalmazó oldatot 20 perc jégen történt tárolást követően centrifugáltuk le, 1000 g-vel, 15 percen keresztül, 4°C-on. A fehérjét tartalmazó felülúszót használtuk a továbbiakban Western blothoz. Az oldatok fehérje tartalmát Bio-Rad fehérje meghatározó oldattal végeztük fotometriás módszerrel. A géltre ezt követően azonos fehérjetartalmú lizátumot töltöttünk. A nitrocellulóz membrán blokkolását az alkalmazási előírás szerint végeztük, majd az elsődleges antitestet – mely poliklonális anti-foszfo-ERK 1/2 illetve poliklonális anti-foszfo-JNK volt - 1:1000 hígításban használtuk (Cell Signaling). A másodlagos antitest 1:5000 hígítású, kecskében termeltetett, torma-peroxidázzal konjugált, anti-patkány IgG ellenes antitest volt (Dianova).

### 5.6.2. Eredmények

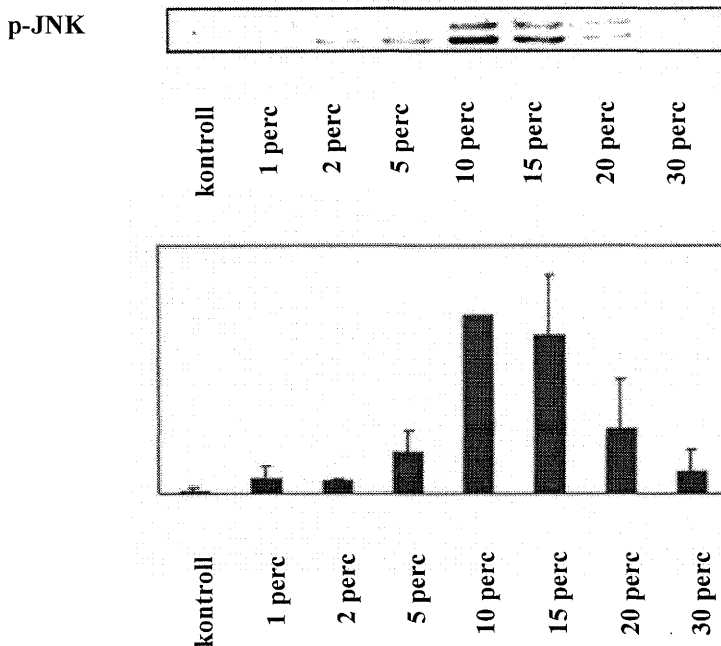
Az oszlopdigrammok 4-6 egymástól független kísérlet átlagát ábrázolják. A 22. ábra szerint az Ald időfüggően fokozza az ERK 1/2 foszforiláltságát, mely maximumát a 10.

percben éri el.



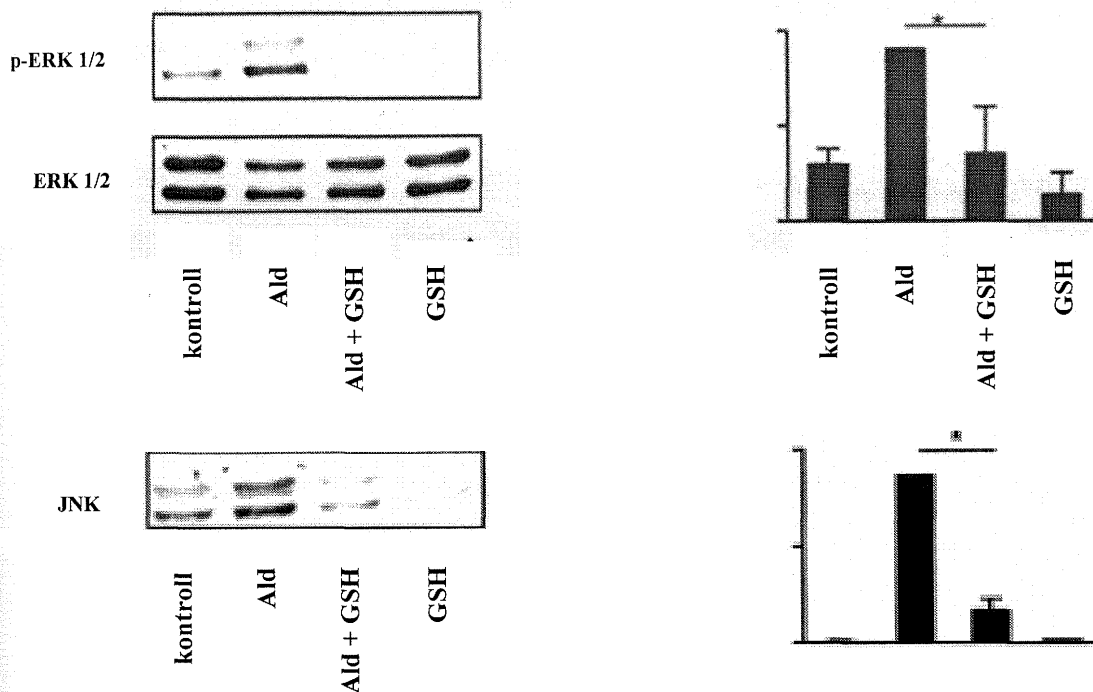
**22. ábra** Az aldoszteron időfüggően indukálja az ERK1/2 foszforilációt, simaizom sejtekben.

A 23. ábrán látható, hogy az Ald a JNK foszforiláltságát is időfüggően fokozza, mely a 10. percben éri el a maximumot.



**23. ábra** Az aldoszteron időfüggően indukálja a JNK foszforilációt, simaizom sejtekben.

Mindkét MAP kináz Ald-kiváltotta aktiválása gátolható a nem specifikus scavenger GSH-val (2 mM, 24. ábra) és a szintetikus  $O_2^{\cdot}$  szabadgyök-fogó Tironnal (10  $\mu$ M, ábrán nem látható). Az Ald kiváltotta ERK 1/2 foszforiláció, EGFR-gátló, AG 1478-cal csökkenthető volt.



**24. ábra** A redukált glutation (GSH, 2 mM) gátolja az aldosteron (Ald) indukálta ERK 1/2 és JNK foszforilációt ( $p < 0,01$ ).

### 5.6.3 Összefoglalás

Az Ald nem transzkripciófüggő úton aktiválja az ERK 1/2 és a JNK kinázokat. Az Ald hatása a simaizom sejtekben időfüggő és szükséges hozzá az EGFR, valamint szabad gyökök közreműködése is.

### 5.7. Az Ald fokozza az Ang-- kiváltotta ERK 1/2 és JNK foszforilációt.

A RAAS központi elemének az Ang-nak a fontos szerepe közismert a CV morbiditás és mortalitás szempontjából. Ma már receptorális hatásmechanismusa is egyre jobban tisztázott. Szerepe igazolt többek között a sejtek növekedésében, migrációjában, adhéziójában, a gyulladásban, a fibrózis kialakulásában. A dTGR patkányok vizsgálata során felvetődött, hogy az Ald révén fokozódik az Ang hatása.



### 5.7.1. Módszer

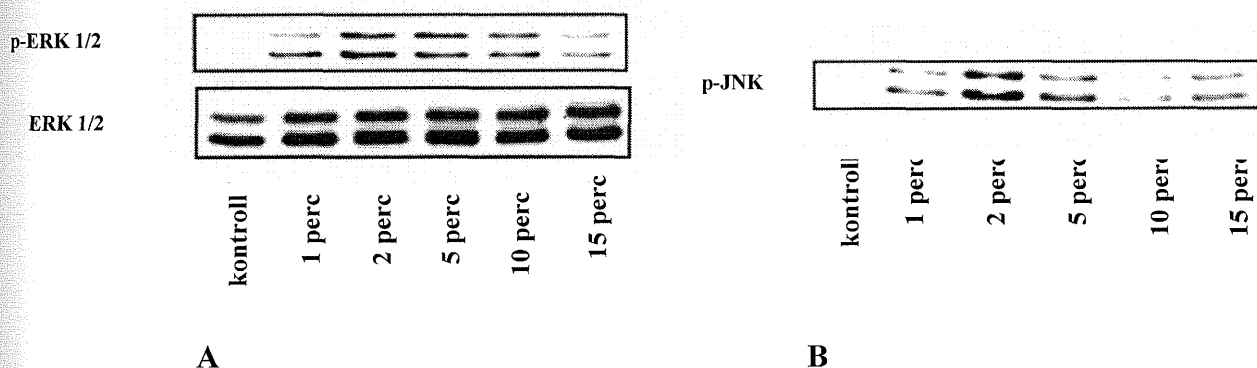
Vizsgálatainkhoz az 5.6.1. pont alatt leírt anyagokat és módszereket használtuk kiegészítve MAPK vizsgáló kittel (MAPK assay kit; Cell signaling) valamint konfokális fluoreszcens mikroszkópiával. A simaizom sejteket  $10^{-7}$  M Ang-gal és  $10^{-7}$  M Ald-dal stimuláltuk egyidejűleg és külön-külön is.

A MAPK vizsgáló kittet az előírás szerint használtuk. Összefoglalva, a sejteket, a stimulálást követően jéghideg PBS-sel öblítettük le, majd lízis-puffert helyeztünk rájuk. A sejteket felkapartuk és ultrahanggal feltártuk. Ezt követően lecentrifugáltuk. A felülúszóból fehérje meghatározást végeztünk, majd 200 µg-nyi fehérjét tartalmazó oldathoz hozzáadtunk 15 µl reszuszpendált, immobilizált, foszfo p44/42 MAPK monoklonális antitestet. Egy éjszakán át  $4^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk az oldatot folyamatos rázás mellett. Ezt követően, centrifugálás után az üledéket kétszer mostuk 0,5 ml lízis-pufferrel, jégen tartva az oldatokat. Az üledéket 50 µl kináz pufferbe vettük fel és 200 µM ATP-vel valamint 2 µg Elk-1 fúziós fehérjével egészítettük ki. Fél órás szobahőn való inkubációt követően a reakciót nátrium dodecil szulfát (SDS) pufferrel állítottuk le. A mintákat 5 perces forralást követően Western blottal dolgoztuk fel. Az elsődleges antitest foszfo-Elk-1 antitest 1:1000 hígítása volt, a másodlagos antitest, pedig torma-peroxidázzal konjugált anti-nyúl antitest volt, 1:2000 hígításban.

A konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatot Haller és mtsai által leírtak szerint végeztük.<sup>180</sup> A sejteket fedőlemezre tenyésztettük. A kísérletekhez Ang és Ald  $10^{-7}$  M koncentrációját használtuk. A stimulációt követően PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel kezeltük a sejteket. Ezt követően ismét PBS-es lemosás és 80%-os jéghideg metanollal  $-20^{\circ}\text{C}$ -on történő kezelés következett, 20 percig. Ismételten PBS-sel mostuk a sejteket, majd az elsődleges és másodlagos antitesttel történő inkubálást követően ágyasztuk be őket tárgylemezen. Két vizsgáló egymástól függetlenül értékelte azonos kísérlet 40-80 sejtjét a stimuláló ágens ismerete nélkül. A mérést az MRC Laser Sharp program hisztogram funkciója segítségével készítettük. A szubcelluláris régiók kiszűrése manuálisan, a számított fluoreszcencia átlagos intenzitása, pedig a körvonalazott területből történt. Az értéket a megfelelő sejt terület átlagos fluorezcens intenzitásaként fejeztük ki.

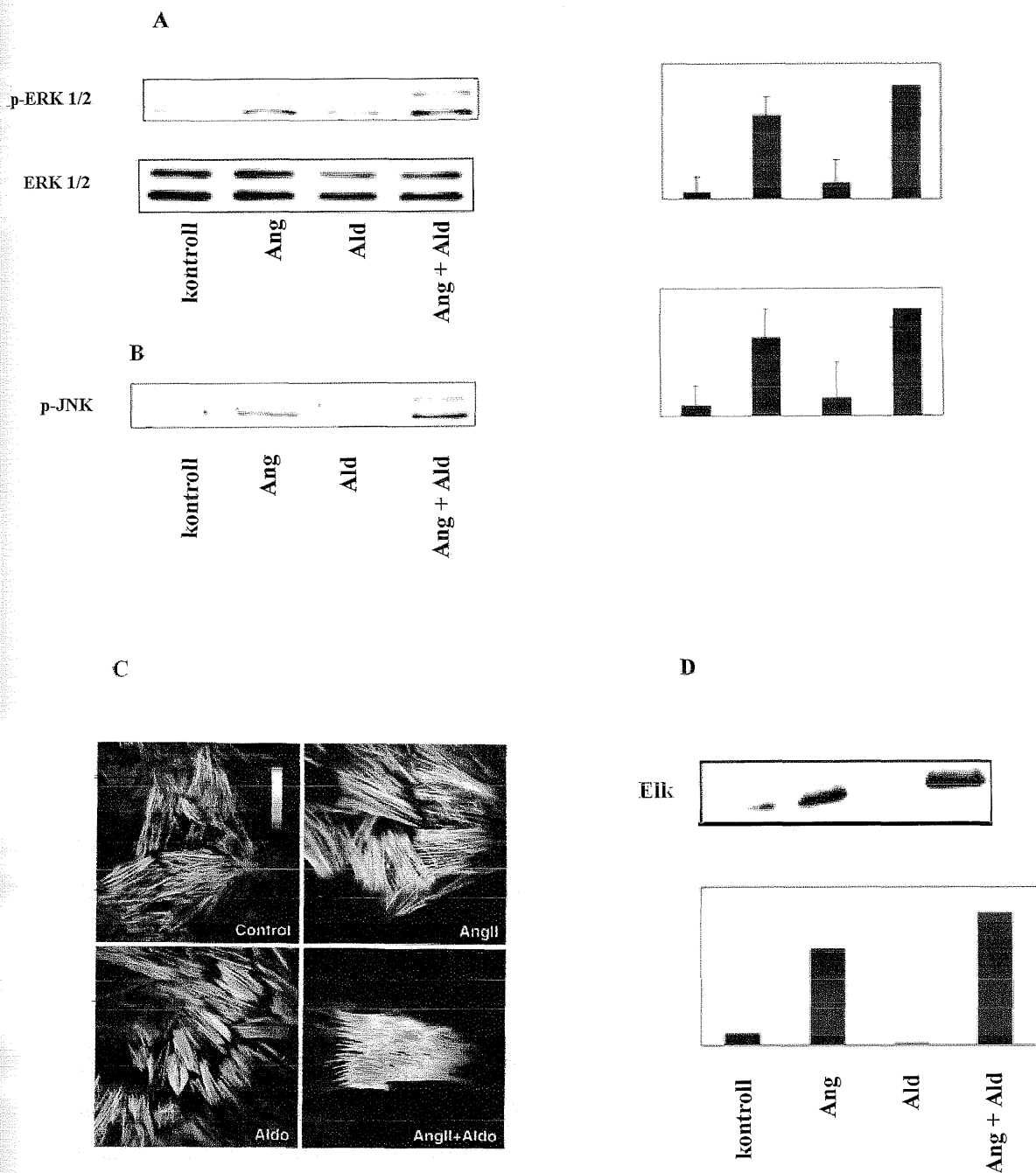
### 5.7.2. Eredmények

Az Ang kiváltotta ERK 1/2 foszforiláció maximumát a 2. percben éri el. (25/A. ábra) Az Ang indukálta JNK foszforilációja szintén a 2. percben tetőződött. (25/B. ábra) Az Ald indukálta ERK 1/2 foszforiláció a stimulációt követő 10. percben éri el csúcspontját, hasonlóan a JNK indukálta foszforilációhoz, amint azt már láthattuk. (22. és 23. ábra)



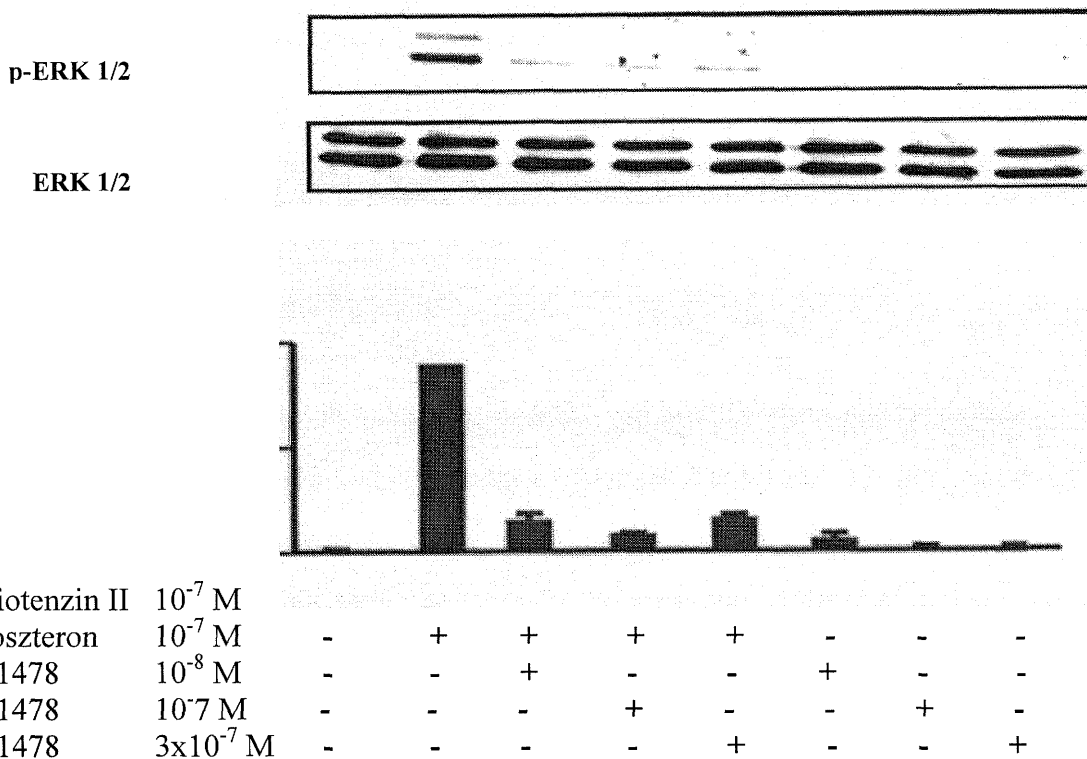
**25. ábra** Az angiotenzin II időfüggően indukálja az ERK 1/2 és a JNK foszforilációt simaizom sejtekben.

Az ERK 1/2 foszforilációja az Ang és az Ald együttes adását követő 2. percben éri el hatásmaximumát, míg a JNK foszforiláltsága már az első percben tetőzött. (26/A., 26/B. ábra) Mind a konfokális mikroszkópos (26/C. ábra) mind a MAPK vizsgáló kittel (26/D. ábra) végzett vizsgálatokkal igazoltuk az Ald MAPK foszforilációt fokozó hatását Ang jelenlétében. Az MAPK vizsgáló kittel vizsgáltuk az Erk 1/2 szubsztrátjának, az Elk-nek – mint transzkripciós faktornak – a foszforiláltságát.



**26. ábra** Az aldosteron (Ald) fokozza az angiotenzin II (Ang) indukálta MAPK foszforilációt. **A:** az Ald fokozza az Ang kiváltotta ERK 1/2 foszforilációt simaizom sejtekben a 2. percben ( $p < 0,01$ ). **B:** az Ald fokozza az Ang kiváltotta JNK foszforilációt simaizom sejtekben a 2. percben ( $p < 0,01$ ). **C:** Az Ald fokozza az Ang indukálta ERK 1/2 foszforilációt konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során is az 5. percben. **D:** Az Ald fokozza az Ang indukálta Elk foszforilációt MAPK assay kit vizsgálattal a 2. percben ( $p < 0,05$ ).

Ahogy az Ang és az Ald esetében szabad gyök fogóval sikerült csökkenteni a MAPK-ok foszforilálódását, úgy az Ang és az Ald együttes alkalmazása esetén is sikeresen megakadályozta az aktiválódást mind a GSH, mind a Tiron (ábrán nem mutatott eredmény). A kombináció kiváltotta MAPK foszforiláció gátlható volt AG 1478-cal, hasonlóan az Ald és az Ang indukálta foszforiláció gátláshoz. (27. ábra)



**27. ábra** Az aldoszteron indukálta, angiotenzin II kiváltotta ERK 1/2 foszforiláció epiteliális növekedési faktor receptor (EGFR) függő folyamat. AG 1478-cal (EGFR gátló) előinkubálva simaizom sejteket, gátolható volt az angiotenzin II és az aldoszteron kiváltotta ERK 1/2 foszforiláció a 2. percben.

### 5.7.3. Összefoglalás

Az Ang kiváltotta MAPK foszforiláció Ald-dal fokozható volt. A hatás maximuma már a 2. percben jelentkezett, mely aktivációban a szabad gyököknek és az EGFR-nek fontos szerepük van. A hatás transzkripciós faktorok aktiválásában is megnyilvánul.

### 5.8. A MR-gátlók csökkentik az Ang-indukálta ERK 1/2 foszforilációt és a dTGR patkányokban kialakuló szervkárosodást

Az MR-gátlókról a dTGR-ek vizsgálata során kiderült, hogy, a korábban embereken végzett RALES tanulmányban találtakhoz hasonlóan, csökkenti a kardiális fibrózis kialakulását, valamint megnöveli a túlélést. A fentiek mehanizmusát kutatva kerestük a választ arra a kérdésre, hogy vajon az Ang indukálta celluláris, nem-genomikus folyamatokat befolyásolja-e az MR gátló, mely megakadályozza az Ald receptorhoz való kötődését.

### 5.8.1. Módszer

A sejt kultúrával végzett vizsgálatokhoz az 5.6.1. és 5.7.1. pont alatt leírt simaizom sejttenyészeteket és oldatokat használtuk. A sejteket  $10^{-7}$  M-os koncentrációjával stimuláltuk azt követően, hogy a sejteket 30 percig inkubáltuk  $10^{-6}$  M-os koncentrációjú spirinolaktonnal (Spi). Az így nyert mintákat az 5.6.1. és 5.7.1. pontok alatt leírt módon dolgoztuk fel Western blot-hoz, MAPK vizsgáló kittel végzett kísérletekhez és konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz.

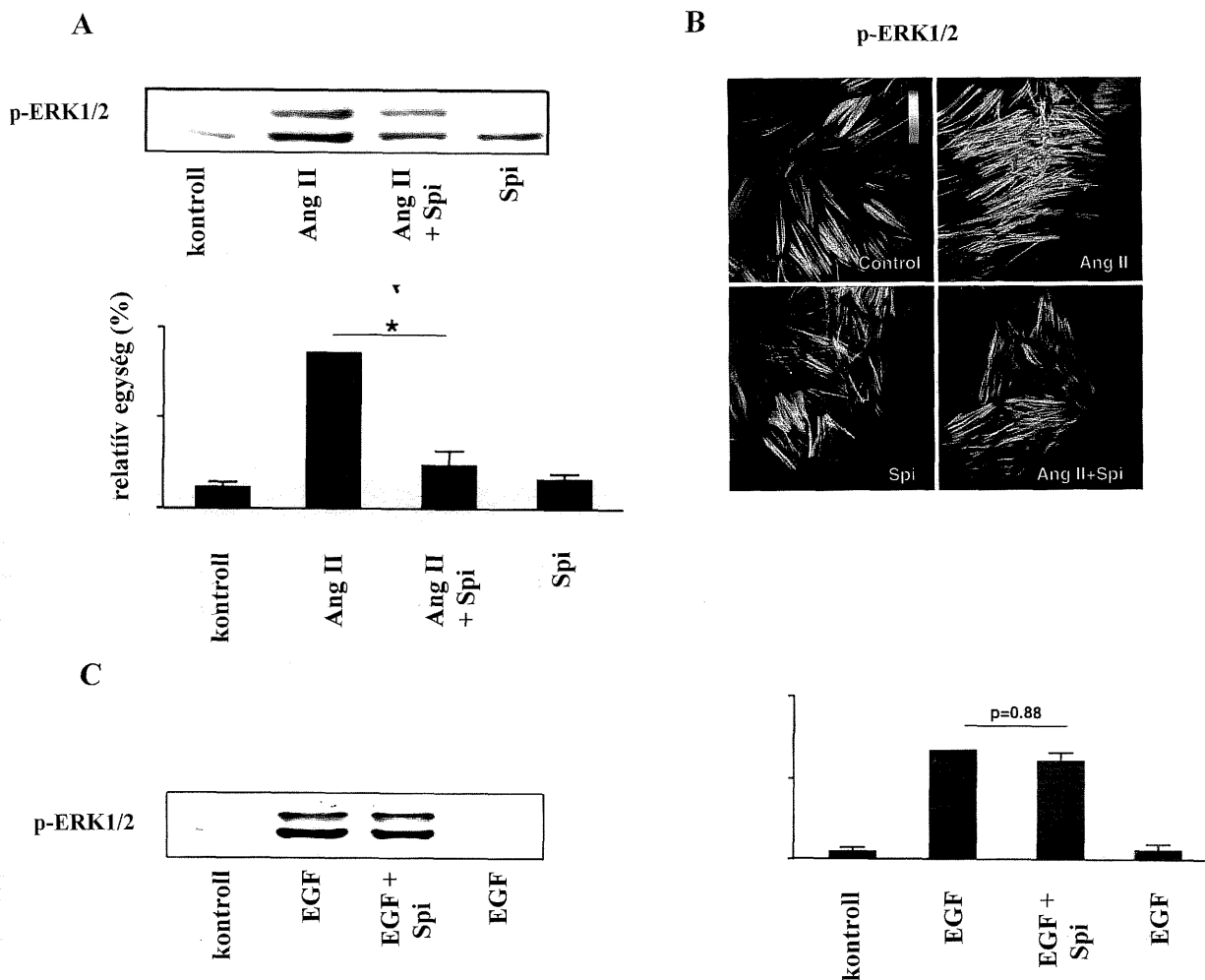
A simaizom sejteken végzett szabad gyök meghatározást fluoreszcens módszerrel, Ohba és mtsai által leírtak szerint végeztük.<sup>181</sup> Összefoglalva, a sejteket fedőlemezen tenyésztettük, 24 órán át szérumban (0,1% BSA) környezetben, majd 30 percen keresztül, sötétben, 37°C-on, DCF-DA jelenlétében tartottuk. Előinkubálásra Spi ( $10^{-6}$  M, 30 perc) vagy 10  $\mu$ M/l koncentrációjú dimetil-szulfoxidot (DMSO, 30 perc; a fluoreszcens indikátor oldószere, kontrollként) használtunk. A stimuláció  $10^{-7}$  M-os koncentrációjával történt. A méréseket Zeiss fluoreszcens mikroszkóppal végeztük 488 nm excitációs és 513 nm emissziós hullámhosszon. A fluoreszcens intenzitást 5 különböző, 15-20 sejtet tartalmazó sejtcsoportnál mértük, a relatív fluoreszcens intenzitást pedig az 5 csoport értékének átlagával tüntettük fel.

A simaizom sejtek MR expresszióját is vizsgáltuk TaqMan polimeráz lánreakció segítségével. A receptor mRNS jelenlétét a következő primer szekvenciákkal vizsgáltuk: MR-F, GCACTCACACCATCCCCG; MR-R, TCGTAGCCTGCATACACGGTC; MR-P, FAM-CCATGATCCTGGAGAACATCGAGCCT-TAMRA.

Az in vivo kísérleteket 4 hetes, hím, dTGR (n=28) és azonos korú, nem transzgenikus SD patkányokon (n=7) végeztük. A dTGR csoport 14 tagja 3 héten keresztül kapott MR gátló eplerenont (100 mg,  $\text{kg}^{-1}$ ,  $\text{nap}^{-1}$  dózisban). A szisztolés vérnyomás mérését farokra helyezhető érzékelő segítségével végeztük éteres bódítás alatt. A vizelet minta gyűjtése 24 órán keresztül folyt. A vizelet albumin meghatározás ELISA segítségével történt. Az echocardiográfiás vizsgálat M-módú és pulzus hullám Doppler módszerrel történt éteres bódításban. A Doppler vizsgálatot színes Dopplerrel végeztük. A transzducer 7 MHz-es volt. Három mérés átlagát összegeztük. Az állatokat 7 hetes korukban leöltük.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a szívet és vesét feldaraboltuk, majd izopentánban (-35°C) gyorsfagyasztottuk és -80°C-on tároltuk. A fagyasztott szöveteket kriosztátban 6  $\mu$ m vékonyra metsztük és szobahőn hagytuk megszáradni. Hideg acetonnal történt fixálást

követően a mintákat szobahőmérsékleten szárítottuk és TRIS pufferrel mostuk (0.05 M/L Tris puffer, 0.15 M/L NaCl, pH 7.6). A metszeteket szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd ezt követően 60 percig az elsődleges monoklonális antitesttel (kollagén IV-es típusa vagy foszfo-ERK1/2 elleni antitesttel) kezeltük. TRIS pufferrel történő mosás után a metszeteket másodlagos anti-egér IgG ellenes antitesttel kezeltük 30 percig. Antifoszfataz anti-alkalikus foszfataz antitesttel újabb 30 perces inkubálás következett szobahőmérsékleten. Az immunreakciót naftol-AS-BI-foszfát és neofukszin elegyével tettük láthatóvá. Az endogén alkalikus foszfataz gátlása 10  $\mu\text{mol/l}$  levamizol segítségével történt. A metszetet csapvízzel öblítettük és végül GelTol beágyazó anyaggal ágyasztuk be. Mikroszkóppal (Zeiss AxioPlan-2) történt az értékelés a minták eredetének ismerete nélkül. Minden metszetről 15 területet értékeltünk komputerizált sejtszámláló programmal (K 300 3.0, Zeiss).



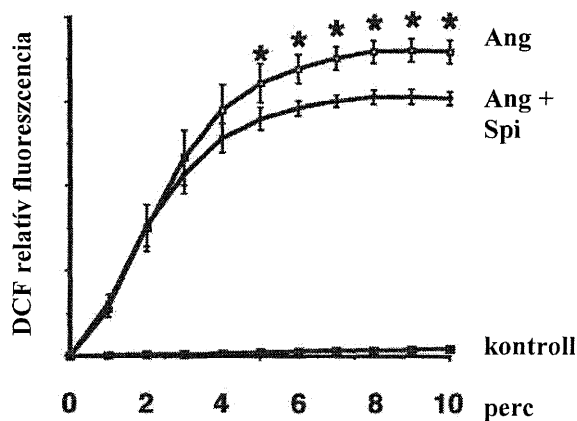
**28. ábra** A spironolakton (Spi) gátolja az angiotenzin II (Ang) kiváltotta ERK 1/2 foszforilációt. **A:** spironolakton 30 perces előinkubációt követően csökkenti az ERK 1/2 foszforilációt az angiotenzin II-hatás 10. percében ( $p < 0,01$ ). **B:** A spironolakton hatása - az angiotenzin II indukálta ERK 1/2 foszforilációra - megfigyelhető konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal is. **C:** A spironolakton nem befolyásolja az epiteliális növekedési faktor (EGF) kiváltotta ERK 1/2 foszforilációt.

### 5.8.2. Eredmények

In vitro kísérleteinkben simaizom sejteket inkubáltunk Spi-nal, majd vizsgáltuk az Ang kiváltotta ERK 1/2 aktivációt. A 28/A ábrán levő Western blot azt mutatja, hogy a Spi az Ang adását követő 10. percben szignifikánsan csökkenti az ERK 1/2 foszforilációját. A Spi fenti hatása az Ang hatásmaximumán (2 perc) nem volt megfigyelhető.

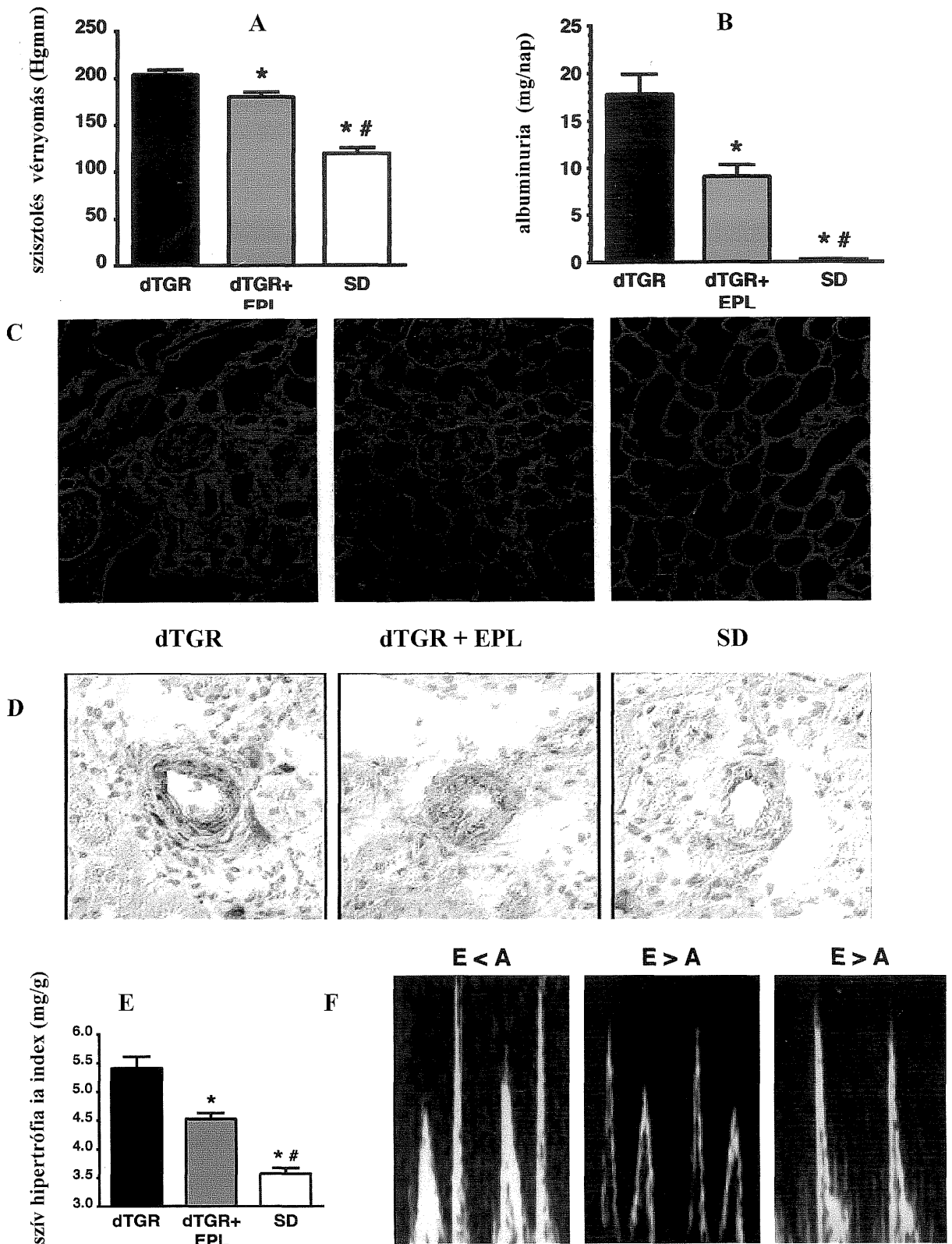
Ugyanezen eredményt találtuk az elvégzett konfokális fluoreszcens vizsgálattal, amit a 28/B ábrán láthatunk.

Élő sejtenyészeten vizsgáltuk a Spi hatását az Ang indukálta szabadgyök-képződésre. A 29. ábrán látható, hogy a Spi az 5. perctől szignifikánsan csökkenti az Ang indukálta szabadgyök-képződést.



**29. ábra** A spironolakton (Spi) szignifikánsan csökkentette ( $p < 0,05$  az 5. percben,  $p < 0,01$  a 10. percben) az angiotenzin II (Ang)-kiváltotta DCF-fluoreszcencia intenzitását, élő simaizom sejtenyészeten.

Az eplerenonnal nem kezelt dTGR patkányok ( $n=14$ ) szisztolés vérnyomása magasabb volt mind a kontroll SD patkányok ( $n=7$ ), mind pedig az eplerenonnal kezelt dTGR patkányok ( $n=14$ ) szisztolés vérnyomásánál ( $p < 0,05$  minden esetben; 30/A ábra). A vizelet albuminürítése jelentősen emelkedett a dTGR patkányokban a kontroll SD patkányok vizelet albuminürítéséhez képest ( $p=0,001$ ). A vizelet albuminürítést az eplerenon jelentősen csökkentette dTGR patkányok esetében ( $p < 0,001$ ; 30/B ábra).



**30. ábra** Az eplerenon (EPL) csökkenti a renin és angiotenzin génre transzgenikus patkányokban (dTGR) kialakuló szervkárosodást **A**: az eplerenon kezelés csökkenti a dTGR-ban mért vérnyomást ( $p < 0,05$ ), viszont nem éri el az egészséges patkányokban (Sprague Dewley (SD)) mért értéket. **B**: az albuminuria szintén csökken eplerenon hatására ( $p < 0,001$ ). **C**: eplerenon hatására jelentősen csökken a glomerulusok, a bazál membrán és a peritubuláris kapillárisok kollagén IV-es festődése. **D**: Az eplerenon csökkenti a ér mediában detektált ERK 1/2 intenzitást. **E**: Eplerenon hatására csökken a szívizom hipertrófia ( $p < 0,05$ ). **F**: Eplerenon hatására javul a diasztolés telődés ( $E > A$ ).



Az eplerenon kezelés csökkentette a kollagén IV-es típusának mennyiségét, a nem kezelt dTGR patkányok veséjében és szívében talált, kollagén IV szinthez képest (30/C ábra). A dTGR patkányok vese artériájának médiájában fokozott ERK 1/2 foszforiláció volt kimutatható, az SD patkányok artéria médiájához képest. Az eplerenon kezelés csökkentette az ERK 1/2 foszforiláltság szintjét (30/D ábra). Az eplerenonnal kezelt patkányokban kisebb volt a szív hipertrófia mértéke ( $p < 0,05$ ; 30/E ábra) és az eplerenon javított a diasztolés diszfunkción is dTGR patkányok esetében (rendezte az E/A arányt) szemben a nem kezelt patkányokkal. A fenti eredményekkel együtt a kezelés ellenére magasabb maradt a szív hipertrófiás indexe az SD patkányokban mértékhez viszonyítva (30/E ábra).

### 5.8.3. Összefoglalás

A fenti eredmények egyértelműen mutatják, hogy az MR gátló Spi jelentősen csökkenti az Ang indukálta ERK 1/2 foszforilációját a simaizom sejtekben. Látható az is, hogy a Spi eredményesen csökkentette az Ang indukálta ERK 1/2 foszforilációban is szerepet játszó szabad gyökök keletkezésének mértékét. Állatkísérletes eredmények alapján látható, hogy az MR gátló eplerenon csökkenti, vagy megszünteti a fibrózist, az albuminuriát, a diasztolés diszfunkciót és a szív hipertrófiás indexének mértékét.

## 5.9. A táplálkozás hatása a szérumban és a vizeletben glikációs végtermékek szintjére

Az ételek sütése, főzése számos AGE-termék valamint nem AGE-termék képződését is eredményezi. A hőkezelés hatására az ételekben keletkező glikációs termékek közül az  $N^{\epsilon}$ -karboximetil-lizin (CML) példáján – mely egyben oxidatív stressz marker is - vizsgáltuk a táplálék eredetű AGE-termékek felszívódását és veseműködésre kifejtett hatását egészséges önkéntesekben.<sup>182</sup>

### 5.9.1. Módszer

A táplálkozás, szérumban AGE szintjére kifejtett hatásának vizsgálatára prospektív, randomizált, cross-over vizsgálatot végeztünk. 24 egészséges önkéntest vontunk be a vizsgálatokba annak tisztázására, hogy a hőkezelt ételek fogyasztása miként befolyásolja a

vizelet albuminürítést, a kreatinin clearancet és a vérnyomást. A vizsgálat 4 hétig tartott. Mértük az önkéntesek szérumszintjének és vizelet CML ürítésének változásait is. A vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük, az önkéntesek megfelelő tájékoztatásban részesültek, majd írásos beleegyező nyilatkozatot tettek. A vizsgált személyek jellemzőit és kiindulási laboratóriumi értékeit az 1. táblázatban tüntettük fel.

*1. táblázat. Az egészséges önkéntesek klinikai paraméterei a vizsgálat kezdetén.*

|                                      | Átlag $\pm$ SD  |
|--------------------------------------|-----------------|
| Életkor (év)                         | 25,0 $\pm$ 5,4  |
| Testtömeg index (kg/m <sup>2</sup> ) | 21,9 $\pm$ 2,2  |
| Plazma fibrinogén (g/l)              | 2,55 $\pm$ 0,45 |
| Plazma glukóz (mmol/l)               | 4,65 $\pm$ 0,47 |
| Szérumsz albumin (g/l)               | 48,0 $\pm$ 2,6  |
| Szérumsz C-reaktív protein (mg/l)    | 1,60 $\pm$ 3,83 |
| Szérumsz HDL koleszterin (mmol/l)    | 1,50 $\pm$ 0,26 |
| Szérumsz összkoleszterin (mmol/l)    | 4,56 $\pm$ 0,66 |
| Szérumsz triglicerid (mmol/l)        | 1,16 $\pm$ 0,64 |
| Vérnyomás                            |                 |
| szisztolés (Hgmm)                    | 115 $\pm$ 10    |
| diasztolés (Hgmm)                    | 72 $\pm$ 9      |

A vizsgálat első hetében minden önkéntes a megszokott módon táplálkozott, csupán a túlzott fehérjebevitel mellőzését kértük. Ennek érdekében részletes diétás tanácsadásban részesültek és a diéta ellenőrizhetősége céljából, diétás naplót vezettek. Az első hetet követően az önkénteseket véletlenszerűen két csoportra ("A" és "B" csoport) osztottuk. Az "A" csoport tagjai a második vizsgálati héten magas fehérjetartalmú, hőkezelt (sütött,

főzött) ételeket fogyasztottak. Ugyanakkor a "B" csoport magas fehérjetartalmú, nyers ételeket kapott. A harmadik héten, az úgynevezett kimosási periódus alatt, az önkéntesek mindkét csoportban ismét az általuk megszokott módon táplálkozhattak a fehérjebevitel mérséklésének javaslatával. Végül a negyedik vizsgálati héten a csoportok diétáját felcseréltük. Az "A" csoport kapott nyers, a "B" csoport pedig hőkezelt, magas fehérjetartalmú ételeket (2. táblázat).

**2. táblázat. A vizsgálat menete.** A táblázatban a cross over tanulmány felépítése látható. A szokásos étrendet követően az egyik csoport hőkezelt fehérjedús diétát fogyasztott 1 hétig, a másik csoport, pedig nem hőkezelt ételeket evett. Kimosási periódust követően a két csoport között megváltozott a diéta típusa.

|                       | Első hét        | Második hét  | Harmadik hét    | Negyedik hét |
|-----------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| A csoport<br>(n = 12) | szokásos étrend | meleg diéta  | szokásos étrend | hideg diéta  |
| B csoport<br>(n = 9)  | szokásos étrend | hideg diéta  | szokásos étrend | meleg diéta  |
| Fehérje<br>tartalom   | 1 g/ttkg/nap    | 3 g/ttkg/nap | 1 g/ttkg/nap    | 3 g/ttkg/nap |

Az első és a harmadik héten az étrend fehérjetartalmát az önkéntesek által készített diétás naplók alapján számítottuk ki.

A vizsgálat második és negyedik hetében - amikor a nyers és a hőkezelt ételek veseműködésre gyakorolt hatását hasonlítottuk össze - az önkéntesek kizárólag a klinikánk dietetikusai által összeállított étrend alapján, a klinikánkon elkészített ételeket fogyasztották. A renális hatások provokálása céljából a hőkezelt és a nyers diéta fehérjetartalmát 3 g/ttkg/nap-ra állítottuk be. Ez az egészséges felnőttek számára a WHO által javasolt napi fehérjebevitelnél (0,8 g/ttkg/nap) közel négyszerese. A tervezett fehérjetartalom elérése érdekében az ételeket ultrafiltrált tejsavó-fehérje koncentrátummal egészítettük ki. A diéták energiatartalma 147 kJ/ttkg/nap (35 kcal/ttkg/nap) volt. A hőkezelésnek ki nem tett tejtermékek, nyers zöldségek és gyümölcsök alkották a nyers diétát. Az önkéntesek a nyers diéta ideje alatt nem fogyaszthattak kávé, teát és kólát, mivel

azok AGE tartalma jelentős.<sup>83</sup> A hőkezelt diéta főtt és sült ételeket tartalmazott. A tejtermékeket, gyümölcsöket, zöldségeket legalább 30 percig érte hőhatás (főzés, sütés, párolás). Emellett a hőkezelt diéta során önkénteseink péksüteményeket és húseleket is kaptak, valamint bármilyen alkoholmentes italt is fogyaszthattak. A hőkezelt és nyers diéta CML és fruktózlizin (a CML prekuzora) tartalmát részletes étrendi leírásainkból a Kielet Egyetem Táplálkozástudományi Intézetének munkatársai számították ki korábbi, különböző élelmiszereken elvégzett méréseik alapján.<sup>82,183,184,185,186,187</sup> A hőkezelt diéta megközelítőleg 60 mg/nap CML-t tartalmazott, míg a nyers diéta CML tartalma elhanyagolható volt. A hőkezelt diéta körülbelül 7-szer annyi fruktózlizint tartalmazott, mint a nyers diéta. A fentiek miatt a továbbiakban a hőkezelt, magas proteintartalmú diétát CML-dús proteinterhelésként, a nyers, magas proteintartalmú diétát pedig CML-szegény proteinterhelésként fogadtuk el.

Az első és a harmadik héten az önkéntesek az általuk megszokott módon étkeztek, ez idő alatt minden étkezésükről diétás naplót vezettek. A diétás naplók alapján az átlagos fehérjebevitel  $1,0 \pm 0,3$  (átlag  $\pm$  SD) g/ttkg/nap, míg a napi energia-felvétel  $123 \pm 37$  kJ/ttkg/nap volt ( $29,3 \pm 8,9$  kcal/ttkg/nap).

Minden vizsgálati hét utolsó napján éhgyomri vérvételt és 24-órás vizeletgyűjtést végeztünk. A glomeruláris funkció méréséhez a 24-órás endogén kreatinin clearancet határoztuk meg. A vizelet albuminürítést immunturbidimetriával mértük. A vérnyomás változásait 24-órás ABPM-val rögzítettük.

A szérum és a vizelet CML koncentrációt kompetitív ELISA-val határoztuk meg a 4G9 monoklonális anti-CML antitest felhasználásával.<sup>188</sup> A CML meghatározás előtt a szérum mintákat Proteinase K hozzáadásával enzimatis hidrolízisnek vetettük alá, hogy a szérum fehérjék rejtett CML epitópjai is hozzáférhetővé váljanak az antitestek számára.<sup>164</sup> Mivel a CML a vizeletben túlnyomórészt szabad, nem fehérjéhez kötött formában van jelen, enzimatis hidrolízist a vizelet CML koncentrációjának meghatározásához nem végeztünk. A hidrolizált szérum és a natív vizelet mintákat 20-szorosra hígítottuk 20 mmol/l TRIS, 150 mmol/l NaCl és 0,05% Tween (ICI America Co., Bridgewater, NJ) tartalmú oldatban (pH 7,4). Az abszolút CML koncentráció meghatározásához N<sup>c</sup>-karboximetil-aminokapronsavat (Alteon Inc., New York, NY) használtunk standardként. Az ELISA lemezeket 1 mg/l AGE-bovin-szérumalbuminnal (AGE-BSA) inkubáltuk 1 órán

át. Háromszori kimosást követően a szérum és a vizelet mintákat, valamint a kalibrációs standardokat 2 órán keresztül inkubáltuk peroxidázzal konjugált monoklonális anti-CML antiszérummal az AGE-BSA-val előkezelt ELISA lemezeken. Újabb háromszori mosás után a színreakciót 0,3 g/l 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline-sulfonsavat és 0,01%-os hidrogén peroxidot tartalmazó 0,01%-os glicin/citrát pufferrel váltottuk ki. Az abszorpciót ELISA automatában (Multiskan Ascent, Labsystems, Helsinki, Finnország) 405 nm-nél mértük (referencia: 603 nm-nél).

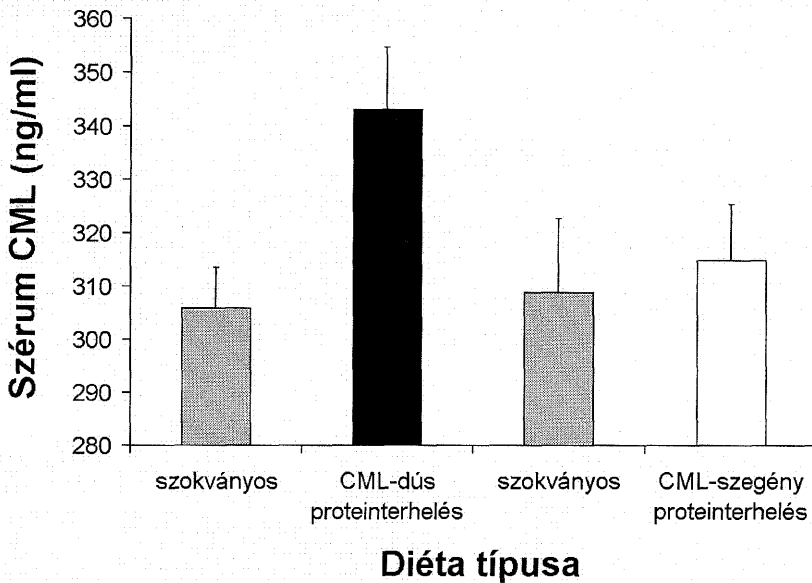
A CML-specifikus kompetitív ELISA szenzitivitása 5 ng CML/ml volt, kevesebb, mint 5% intra- és 8% interassay variabilitással. A módszer mind szérum, mind pedig vizelet minták esetében 10-szerestől 40-szeresig terjedő hígítási tartományban volt lineáris. Ismert mennyiségű standard visszanyerése szérumból  $102 \pm 13\%$ -os, vizeletből  $101 \pm 4\%$ -os volt.

A két csoport azonos diétás időszakainak eredményeit összevontuk, az eredményeket átlag  $\pm$  SEM formában adtuk meg. Az egyes diétatípusok hatásának összehasonlításához egy-mintás t-tesztet használtunk.

### 5.9.2. Eredmények

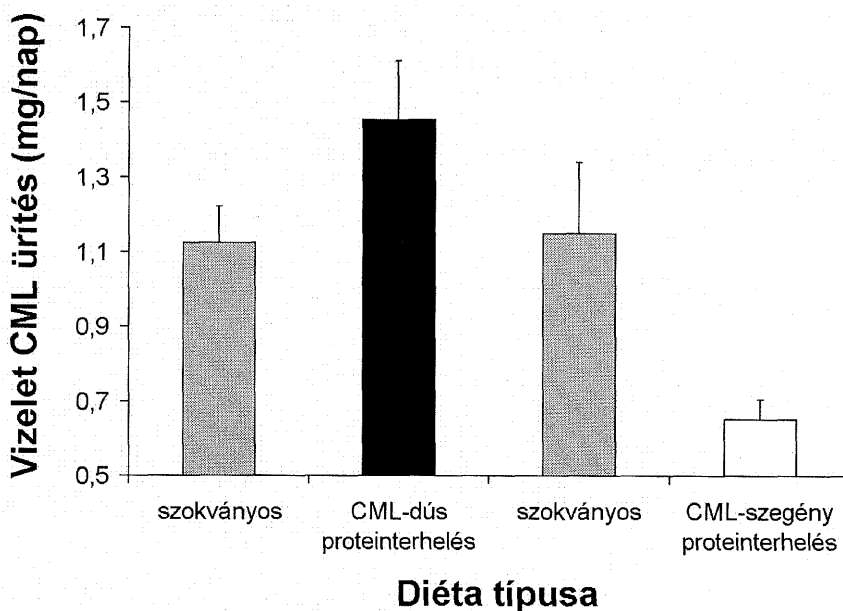
A vérnyomás paraméterei (szisztolés és diasztolés nappali, éjszakai, és 24-órás vérnyomásátlagok, diurnális index, hipertóniás időindex, hipertóniás impakt), a vérgázok (pCO<sub>2</sub>, pH, bázis hiány, aktuális és standard bikarbonát), a 24-órás endogén kreatinin clearance, a szérum C reaktív fehérje (CRP), a szérum albumin, az összkoleszterin és a plazma fibrinogén szintek nem mutattak szignifikáns változást a vizsgálat során.

A szérum CML szint a CML-dús diéta fogyasztása előtt  $306 \pm 8$  ng/ml volt, majd a CML-dús proteinterhelés hatására  $343 \pm 12$  ng/ml-re növekedett ( $p < 0,05$ ). A CML-szegény proteinterhelés előtt a szérum CML szint  $309 \pm 14$  ng/ml-nek, utána pedig  $315 \pm 11$  ng/ml-nek adódott (nem szignifikáns eltérés). A CML-dús, illetve a CML-szegény proteinterhelés hatására kialakult, szérum CML szintek közötti különbség, szignifikánsnak ( $p < 0,05$ ) bizonyult (31. ábra).



**31. ábra** A szérum  $N^{\epsilon}$ -karboximetil-lizin (CML)-szint változás a fehérjében gazdag és fehérjében szegény diéta hatására, a szokványoshoz viszonyítva.

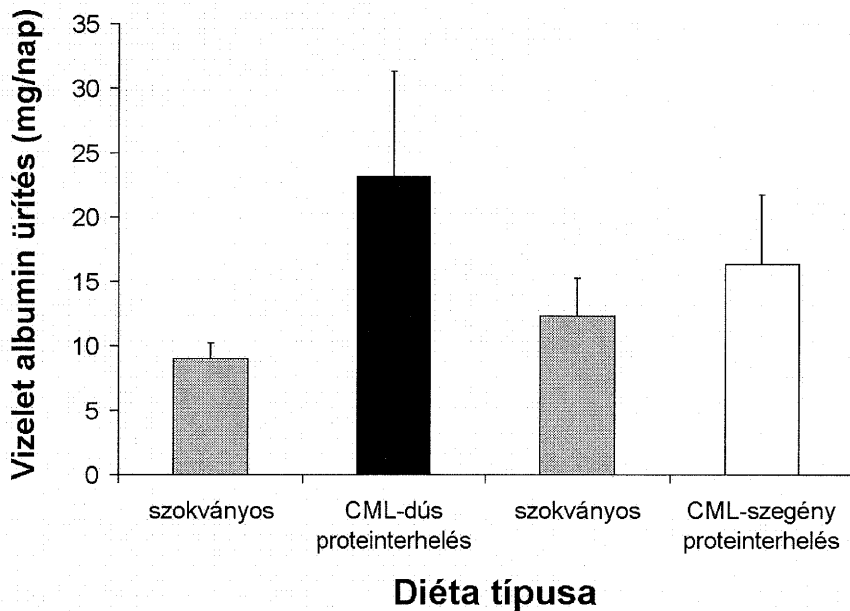
A vizelet CML ürítés a CML-dús proteinterhelést megelőző  $1,1 \pm 0,1$  mg/nap értékről  $1,5 \pm 0,2$  mg/nap értékre emelkedett ( $p < 0,05$ ). Ezt követően a CML-szegény proteinterhelés során  $1,1 \pm 0,2$  mg/nap-ról  $0,7 \pm 0,1$  mg/nap-ra csökkent ( $p < 0,01$ ). A vizelet CML ürítés mértéke a CML-dús proteinterhelés során szignifikánsan ( $p < 0,0001$ ) magasabb volt a CML-ben szegény fehérjeterhelés esetén kapott értéknél. (32. ábra).



**32. ábra** A vizelet  $N^{\epsilon}$ -karboximetil-lizin (CML)-ürítés változása, a fehérjében gazdag és fehérjében szegény diéta hatására, a szokványos étrendhez képest.

A vizelet albuminürítés a CML-dús proteinterhelés előtt  $9,0 \pm 1,2$  mg/nap, utána  $23,2 \pm$

8,2 mg/nap ( $p = 0,0539$ ), illetve a CML-szegény proteinterhelés előtt  $12,3 \pm 2,9$  mg/nap, utána pedig  $16,4 \pm 5,4$  mg/nap volt (nem szignifikáns, 33. ábra).



**33. ábra** Az albuminúria változása a  $N^{\epsilon}$ -karboximetil-lizinben (CML) gazdag és  $N^{\epsilon}$ -karboximetil-lizinben szegény diéta hatására a szokványos étrendhez viszonyítva

A vizsgálat második hetében három önkéntes (mindhárman a "B" csoport tagjai) nem kívánta folytatni a vizsgálatot, mivel a kizárólag nyers ételekből álló diéta nem felelt meg ízlésüknek. 21 önkéntes a vizsgálat teljes időtartama alatt együttműködött.

### 5.9.3. Összefoglalás

Az ételek hőkezelése során keletkező CML a gyomor-béltraktusból felszívódva a keringésbe kerül, melynek egy része a vesén keresztül választódik ki. A CML-dús proteinterhelés az albuminuria fokozódásához vezetett. A fentiekkel ellentétben a magas proteintartalmú, nyers ételek fogyasztása alacsony CML bevitellel társult. Ennek megfelelően hatására jelenősen csökkent a vizelettel ürülő CML mennyisége.

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1 Az MG indukálta arginin-módosulást vas jelenlétében szabad gyökös folyamatok katalizálják

Ahol a fokozott szabadgyök-keletkezés és/vagy fokozott aldehid képződés következtében oxidatív stressz és/vagy karbonil-stressz van jelen - mint pl. cukorbetegségben - a képződő reaktív vegyületek, károsítva a sejtek alkotóelemeit, patofiziológiai folyamatokat indítanak el.<sup>189,190</sup> Amennyiben fokozott a glikáció, fokozódik az aldehidek képződése és kötődése a fehérjékhez.<sup>191</sup> Az MG szérumszintje - hasonlóan a malondialdehidhez - cukorbetegek vérében az egészségesekéhez képest szignifikánsan magasabb, ami MG esetében a kontroll populációban talált érték közel négyszeresét is elérheti.<sup>192,193,194</sup> Keletkezése, részben az MG szintáz és a citokróm P450 IIEI által, részben nem enzimatis úton történik.<sup>195</sup>

Az MG képes reagálni a fehérjék amino csoportjaival, ez által károsítva a fehérjék funkcióját. Az MG argininnel reagálva imidazolont, és/vagy argpirimidint képez.<sup>196,197</sup> Az MG-arginin reakció meglétét ESR-rel igazoltuk.

Az átmeneti fémek szerepe az MG és aminosavak közötti reakcióban sokáig tisztázatlan volt. A vas elektron donor és akceptor tulajdonsága révén, hasonlóan a többi átmeneti fémhez, részt vesz kémiai folyamatok katalizálásában, mint pl. szabad gyökök képzésében.<sup>106,198,199,200</sup> A cukorbetegek szérumának vas-kötő kapacitása csökkent, illetve szöveti raktáraikban a vas szintje magasabb, az egészséges egyénekhez képest.<sup>201</sup> A kialakuló oxidatív stressz a raktárakból történő vas felszabadulásához vezet, amiben a NAD(P)H oxidázoknak lehet szerepe.<sup>105</sup> A szabad intracelluláris vas elsősorban ferro formában van jelen 0,1-1,0  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban.<sup>202</sup>

Kísérleteinkben vvt modellben a vas és az MG kalcium beáramlást váltott ki és felmerült az MG és a vas közötti interakció lehetősége. Az arginin és az MG reakciója kapcsán detektált ESR jel intenzitását a  $\text{Fe}^{3+}$  fokozta, és a  $\text{Fe}^{2+}$  csökkentette. A desferroxamin csökkentette a  $\text{Fe}^{3+}$  hatását. A fentiek alapján a más munkacsoport által kimutatott MG-anion jöhet létre olyan módon, hogy a  $\text{Fe}^{3+}$  elektront vesz el az MG-től és így  $\text{Fe}^{2+}$ -vé alakul (14. ábra). Az MG-anion képes komplexálni a  $\text{Fe}^{2+}$ -t és e komplex – mely sokkal reaktívabb, mint az MG önmagában - reagálhat az argininnel.<sup>203</sup>

Az arginin azért is kiemelten fontos az aminosavak között, mert a vasculáris rendszer szabályozásában kulcsszereppel bír, NO termeléséért felelős NOS enzim szubsztrátja.



## 6.2. Az MG és a $\text{Fe}^{2+}$ hatása a vvt-k kalcium szintjére, oxidatív státuszára és önmagában a vas hatása a fentiekre

Az MG által kiváltott szabadgyök koncentráció-növekedés kalciumszint-emelkedést okoz vvt-kben. Az MG e hatása hasonló a szabadgyök-képződést kiváltó  $\text{Fe}^{2+}$ -höz. Az oxidatív stressz, az emelkedett intracelluláris kalcium szint, az MG magasabb szérum szintje, valamint a vas megnövekedett intracelluláris jelenléte jellegzetes eltérések cukorbetegségben. A fenti folyamatok a vvt membrán rugalmasságának csökkenéséhez illetve elvesztéséhez vezetnek, ami a mikrocirkuláció károsodásával jár együtt. Az MG és vas együttesen kisebb kalcium akkumulációt váltanak ki, mint az MG önmagában. Mind a vas, mind az MG kiváltotta oxidatív stressz és kalcium akkumuláció kivédhető volt, szabadgyök-fogókkal és desferrioxaminnal is. Az MG által okozott kalcium akkumulációt és oxidatív stresszt desferrioxamin gátolta, ami az extracelluláris vas szerepének lehetőségét veti fel a folyamatban.<sup>203</sup> Ez azért is valószínű, mert a desferrioxamin nagyon könnyen jut be a sejtekbe, valamint az alkalmazott SOD hatása gyorsan kifejlődik.<sup>204</sup> A GSH ezen kívül extracellulárisan is megkötheti az MG-t. Vvt-kben a GSH hatékonyan kivédte az MG kiváltotta károsodást. A GSH jótékony hatását két úton fejtheti ki. Hatékonyságában a szabadgyök-fogó tulajdonság mellett szerepe van a glyoxaláz útvonalnak. A glyoxaláz úton képes metabolizálni a szervezet az MG-t. Vizsgálataink azt is igazolták, hogy MG hatására csökken a vvt-k alacsony molekulású thiol tartalma, ami az oxidatív stressz szerepének újabb igazolása.<sup>205</sup> A fentiekből arra következtethetünk, hogy az MG toxikus hatása transzmembrán úton elsősorban sejt felszíni módosításokat idéz elő fehérjékben és lipidekben, mely módosulások többek között a vvt membrán fluiditásának elvesztéséhez, valamint ozmotikus stabilitásának csökkenéséhez vezetnek, így hozzájárulva a cukorbetegség szövődményeinek kialakulásához.<sup>206</sup>

## 6.3. A dohányfüst és a formaldehid hatása az endothel sejtek bradikinin-kiváltotta kalciumszint változására és a sejtek redox státuszának alakulására.

A dohányfüst és a formaldehid koncentrációfüggően gátolják a bradikinin-kiváltotta kalcium-szint növekedést. A dohányzás eNOS-NO-cGMP útvonalra kifejtett hatása nem gátolható SOD, kataláz és desferrioxamin segítségével. Ebből arra következtethetünk, hogy a fenti folyamat nem  $\text{O}_2^{\cdot}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ , vagy lipid peroxidáció függő. A GSH és más thiol csoport

tartalmú vegyület – nem specifikus szabad gyök fogóként – sikeresen csökkenti a dohányfüst károsító hatását.<sup>206,207</sup>

A dohányfüst a GSH mellett reakcióba lép a sejtek fehérjéinek thiol csoportjaival is. A fehérjék thiol csoportjának oxidációja, elsősorban a cisztein csoportokkal létrejött reakción keresztül, közvetlenül gátolhatja az agonista anyagok kiváltotta, ionizált kalcium-szint növekedést. A cisztein csoportok fontos szerepet játszanak az inozitol 1,4,5-trifoszfát érzékeny kalcium csatornák nyitásában az endoplazmatikus retikulumban.<sup>208</sup> A fentiek mellett az oxidatív stressz hatására a sejtmembrán depolarizációja révén, indirekt módon is gátolható az agonisták indukálta kalcium beáramlás. A nátrium csatorna fehérjei oxidatív stressznek kitéve a csatorna megnyílását, ezen keresztül pedig a sejtek depolarizációját okozzák.<sup>209</sup> A megnövekedett intracelluláris kalcium szint aktiválja a thiol csoportokat tartalmazó,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-áz enzimet. Amennyiben a thiol csoportok reagálnak a szabad gyökökkel, az enzim aktiválódása kárt szenved, és így zavar keletkezik a sejtek repolarizációjában. A feszültség-függő kalcium csatornák működéséhez szükséges a sejtmembrán depolarizációja, aminek következtében kalcium áramlik a sejtekbe. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz szintén thiol tartalmú enzim, melynek funkciója károsodik oxidatív stressz hatására, és így további depolarizációt okoz.<sup>210</sup>

A formaldehid bradikinin-kiváltotta kalcium-beáramlásra kifejtett gátló hatása, az IP-3 receptorban levő argininnel történő reakciója útján alakulhat ki. Az IP-3 receptor IP-3 kötő részén találhatóak arginin aminosavak.<sup>207</sup> Az arginin formaldehiddel történő reakciója során létrejövő kovalens kötésű vegyületeket részletesen leírták különböző fehérjék esetében.<sup>211</sup> Kísérleteinkben a GSH megakadályozta a formaldehid gátló hatásának kifejlődését a bradikinin kiváltotta intracelluláris kalcium-szint növekedésre.<sup>212</sup> A dohányzás, bár fokozza az eNOS expresszióját, annak aktivitása mégis károsodást szenved, ami a szöveti NO szint csökkenéséhez vezet. Ezen folyamat létrejöttében szerepe lehet az agonista indukálta intracelluláris kalcium szint növekedés gátlásának is. A fenti folyamatban bizonyítottan szerepe van az oxidatív stressznek.<sup>213</sup>

#### **6.4. Az Ald hatása az Ang-indukálta ERK 1/2- és JNK-foszforilációra simaizom sejtekben**

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy mind az Ang mind az Ald fokozta az ERK 1/2 és JNK foszforilációját simaizom sejtekben. Ezen stimuláció időfüggőnek bizonyult. Szabad gyök

góval (GSH és tiron) és az AG 1478-cal (EGFR gátló) meg tudtuk akadályozni az Ang kiváltotta ERK 1/2 foszforilációt. JNK esetében, az irodalommal összhangban, a scavengerek hatásosan gátolták a foszforilációt.<sup>139</sup> Az Ang-indukálta ERK 1/2 aktivációt lehetően több elképzelés létezik. Míg egyesek szerint az ERK 1/2 foszforilációjához szükség van a PKC aktiválódására és az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint növekedésére, addig mások a  $Ca^{2+}$ -tól független ERK 1/2 aktiváció mellett érvelnek.<sup>124,131,214</sup> Napjainkban végzett kísérletek mutatták ki, hogy a simaizom sejtekben az Ang által kiváltott ERK 1/2- és p38-kináz foszforiláció egyaránt mátrix metalloproteináz (MMP)-függő folyamat.<sup>215</sup> Az Ang indukálta MMP aktiválódás pedig Src kináz-függő.<sup>216</sup> Újabb közlemények az MMP-7 szerepét tartják fontosnak a fenti folyamatban.<sup>217</sup> Az MMP hatására a HB-EGF egy része elhasítódik, majd kapcsolódva az EGFR-hez aktiválja azt. Az EGFR fontos szerepet tölt be az Ang és Ald mediálta sejtszintű hatásban, az EGFR ugyanis felelős az Ang indukálta elhúzódozó szabadgyök-képződésért és az ERK 1/2 foszforilációért.<sup>23,218</sup> Az EGFR-hez kapcsolódásakor az adapter fehérjék kapcsolódnak, így a Ras fehérjén keresztül közvetlenül aktiválni képes az ERK 1/2 kaszkádot. A  $Ca^{2+}$  szerepét a folyamatban az igazolja, hogy A23187 ionoforral szintén kiváltható volt az adapter fehérjék kapcsolódása.

Számos kutatócsoport igazolta a szabad gyökök szerepét az Ang indukálta sejtszintű hatás kifejlődésében.<sup>219,220,221</sup> Az Ang a NAD(P)H aktiválásával elhúzódozó, közel 6 órás szabadgyök-termelést képes kiváltani.<sup>23</sup> A korábban hatékonynak bizonyult tiron – mely antioxidatív szuperoxid szabadgyök-fogó -, SOD és difenilén iodonium (NADPH-oxidáz gátló) mellett N-acetyl ciszteinnel is sikerült megakadályozni az Ang hatására kialakuló EGFR foszforilációt.<sup>222,223,224</sup> Antioxidánsok megakadályozták az HB-EGF aktivációját és az EGFR asszociációját az adapter fehérjékkel.<sup>225,226</sup> Az Ang által kiváltott ERK 1/2 foszforiláció szabadgyök-függő voltát nem sikerül igazolni.<sup>227,228</sup> A JNK foszforilációja szintén szabadgyök-függő folyamat, amely foszforilációban az EGFR nem vesz részt.<sup>229,230</sup> Napjainkban végzett kísérletek a Rac-1 fehérje szerepét látszanak igazolni a JNK aktiválásában.<sup>231</sup> Egy ilyen pont lehet, az általunk nem vizsgált src kináz.<sup>232</sup>

Az Ald-dal kapcsolatos kutatások ma reneszánszukat élik. A só-víz háztartással kapcsolatos hatása, amelyet intracelluláris receptorhoz kötődve fejt ki, genomikus szinten, már hosszú évtizedek óta ismert. Ezzel szemben az intracelluláris hírvivő rendszer aktiválásán keresztül kifejtett hatásait – a fehérje hormonokhoz hasonló módon - napjaink

kutatásai térképezik fel egyre részletesebben. Azt, hogy az Ald simaizom sejtekben néhány percen belül képes indukálni az ERK 1/2 foszforilációt csak az előző évtized végén sikerült igazolni, szemben az Ang indukálta ERK 1/2 foszforilációval, mely már 1992-ben igazolást nyert.<sup>233,234</sup> Az Ald fokozza az EGF kiváltotta ERK 1/2 foszforilációt és megnöveli az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintet.<sup>117</sup> Az EGFR-rel transzfektált kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteken végzett kísérletek szintén megerősítik az EGFR szerepét az Ald indukálta celluláris válaszban, mely sejtek esetében transzfektáció nélkül az EGF és az Ald hatástalan maradt.<sup>235</sup>

Az Ang kiváltotta ERK 1/2 és JNK foszforiláció Ald-al fokozható volt. Mind az Ang, mind az Ald esetében gátolható volt a MAPK foszforilációja GSH-val (nem specifikus szabad gyök fogó) és tironnal ( $O_2^{\cdot}$  szabad gyök fogó).<sup>139</sup> Ez a szabad gyökök hírvívő szerepét igazolja az Ang és az Ald sejt szintű hatásában. EGFR gátlóval megerősítettük a már ismert tény, hogy mind az Ang, mind az Ald kiváltotta ERK 1/2 foszforiláció EGFR függő. Az előzőek ismeretében az az eredmény, hogy az Ald és az Ang együttesen fokozza a MAPK foszforilációt, feltételez egy kapcsolódási pontot az ERK 1/2 foszforilációjához vezető útvonalon. A két polipeptid külön receptorokhoz kapcsolódva fejt hatását és mindkettő hatása gátolható scavengerrel valamint EGFR-gátlóval. A fentiek arra engednek következtetni, hogy a korai NADPH oxidáz aktivációtól az EGFR foszforilációig tartó lépcsőn keresztül valósul meg a két hatás ill. útvonal találkozása.<sup>19</sup> Egy ilyen kapcsolódási pont lehet a c-src kináz, mely kináz szerepet játszik az EGFR kaveolákból történő kiszabadulásában. Az Src kináz ezen hatására pedig szükség lehet az EGFR transzaktivációjához.<sup>236</sup> A folyamat során képződő szabad gyökök szerepének fontosságára utal, hogy szabadgyök-fogóval sikerül gátolni mind az ERK 1/2, mind a JNK foszforilációját. A két anyag együttes alkalmazása esetén megfigyelt fokozott hatás szempontjából tovább erősíti a szabad gyökök fontos szerepét az a tény, hogy az ERK 1/2 foszforilációja és a JAK2 kináz aktiválása is gátolható volt szabad gyök fogóval, tehát a JAK2 kináz foszforilációja, hasonlóan a JNK foszforilációjához, nem EGFR függő, hanem szabadgyök-függő folyamat.<sup>237</sup>

Korábbi tanulmányokból jól ismert, hogy az Ang és az Ald jelenléte számos káros folyamat indukciója mellett kóros körülmények között hipertrófiát indukál, valamint fibrózishoz vezet.<sup>236,238,239,240,241</sup> Kísérleteink arra mutattak rá, hogy amennyiben az Ang és az Ald nagyobb mennyiségben van jelen vagy/és hatásuk bizonyos körülményeknek

köszönhetően fokozott, úgy együttesen képesek fokozni a káros folyamatokat a renin-angiotenzin-aldoszteron klasszikus útvonaltól függetlenül is.

### 6.5. A MR-gátlók hatása az Ang-indukálta ERK 1/2 foszforilációra simaizom sejtekben és a dTGR patkányokban.

A dTGR-eken végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy az MR-gátló eplerenon csökkentette az albuminuria, a szisztolés vérnyomás, a diasztolés diszfunkció, a szív hipertrofia mértékét, valamint a kollagén-IV-es típusának mennyiségét a szívizomzatban a fokozott működésű renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerrel rendelkező állatokban. Az eplerenon csökkentette az ERK 1/2 foszforiláció mértékét a dTGR-ek ereiben.<sup>139</sup> Az MR-gátlók hatásának alapja, hogy az MR a vesén kívül számos szövetben expresszálódik, többek között a szívben is.<sup>151</sup> Northern blot, reverz transzkriptáz PCR, in situ hibridizáció valamint immunohisztokémiai vizsgálatokkal próbálták lokalizálni az MR eloszlását szubcelluláris szinten, azonban a mai napig nem sikerült ezt megállapítani. A szívizom sejtek, és a simaizom sejtek mellett az endothel sejtek és a fibroblasztok is expresszálják az MR-t. In vitro kísérletek igazolták, hogy az Ald mellett a glükokortikoidok is képesek kapcsolódni az MR-hez.<sup>242</sup>

A emelkedett szérumszintű Ald és a szívben talált fibrózis közötti kapcsolatot állatkísérletekkel sikerült igazolni.<sup>243,244</sup> DOCA-só modellel nyert eredmények arra a következtetésre vezettek, hogy mind a szívizom sejtekben talált  $\text{Na}^+$ -felvételért, mind a fibrózisért az MR tehető felelőssé. Ezt megerősített az is, hogy Spi-vel gátolható volt a folyamat.<sup>245</sup> Több korábbi tanulmány az Ang szerepét állapította meg a szívben talált fibrózis kialakulásáért, már csak azért is, mert Ang-al fokozható volt a szívizom Ald-termelése. Összetettebbé teszi a fenti képet az, hogy az intravénásan adott Ald állatokban fibrózist indukál a szívben, még ACE-gátló-kezelés mellett is.<sup>246</sup> Spontán hipertenzív patkányokban alkalmazott Spi és ACE-gátló kezelések közül csak a Spi gátolta a fibrózis kialakulását.<sup>247</sup> Ma már tudjuk, hogy a Spi a vérnyomástól függetlenül csökkenti a szív hipertrofiáját és fibrózisát.<sup>237</sup> A fenti adatok arra engednek következtetni, hogy az Ald a RAAS többi elemétől függetlenül is képes fibrózist indukálni a szívben.

Az Ald és az Ang hatását a sejtekre és egymás hatásának szabályozására számos tanulmány vizsgálta. Simeaizom sejteket Ald-dal inkubálva megnőtt az Ang receptor expressziója. Ang-gal stimulálva a sejteket fokozódott a PLC aktivitása is, az Ald

megakadályozta az Ang által kiváltott AT<sub>1</sub> receptor-szám csökkenést.<sup>248</sup> További vizsgálatok kimutatták, hogy az Ald az AT<sub>1</sub> receptor számbeli növekedését indukálja és ez által az Ang kiváltotta diacilglicerol-képződést és az intracelluláris kalciumszint növekedését továbbemeli.<sup>249</sup> Állatkísérleteinkben a genomikus és nem-genomikus hatás elkülönítésére nem volt lehetőségünk. In vitro végzett kísérletek, a rövid időtartam, valamint a transzkripció és translációgátlók alkalmazása azonban megerősítette a nem-genomikus hatás fontosságát. Az Ald nem-genomikus hatását emberben szintén igazolták.<sup>250</sup> Greene és mtsai, részben nephrectomizált patkányokon végzett kísérletekkel megerősítették, hogy az Ald hatásának nem-genomikus összetevője is lehet.<sup>251</sup> 5/6-od nefrektomizált patkányokban Ald adásával, ACE gátló és AT<sub>1</sub> receptor blokkoló kezelés ellenére kifejlődött a fibrózis. Az Ald-ot nem kapó patkányokban kivédhető volt a károsodás. Az MR blokkoló Spi nem védte ki az Ald hatását a fenti tanulmányban az általunk használt Epl azonban kivédte az Ald hatását. Ezen túl eredményeink az Ang és az MR közötti interakcióra engednek következtetni. Mint már a bevezetőből ismert, az Ang számos hatást fejt ki celluláris szinten, mely hatásokért elsősorban az AT<sub>1</sub>-receptor felelős. Az AT<sub>1</sub>-receptor aktivációja két szakaszban aktiválja a NADPH oxidáz enzimet. Az első egy korai – 30 másodperc alatt lezajló – aktiváció, mely PKC függő és szükséges hozzá az Src kináz és az EGFR foszforilációja. A második, elnyújtottabb szakaszban a PI-3 kináz aktiválódik, mely fokozza a Rac - kis molekulásúlyú G-fehérje - foszforilációját, ami elhúzódóbb (6 órán túli hatás) szabadgyök-termelést vált ki a NADPH oxidáz aktiválásával.<sup>23</sup> Az Ald-kiváltotta szabadgyök-képződés 6-8 perccel később jelentkezik, mint az Ang estében. Ebből arra következtethetünk, hogy az Ald nem befolyásolja az Ang indukálta korai szabadgyök-képződést. Ez utóbbi sejtes modellben leírt eredményt állatkísérletes modellben is igazolták. Ald-dal infundált patkányokban emelkedett a vérnyomás, és a patkányokból izolált mesenterialis artéria média/lumen hányadosa ésmindkettő a NADPH oxidáz indukálta szabad gyök képződés eredménye volt.<sup>252</sup> A fentiek mellett patkányokban Ald-ot és só-t tartalmazó diéta fogyasztását követően fokozott NADPH aktivitást és NF-κB aktivációt találtak.<sup>253</sup> dTGR-ekben kimutatták, hogy a NADPH oxidáz aktivitása jelentősen fokozott és a gyulladáshoz kapcsolódó reakcióban aktivált gének indukálásáért felelős NF-κB és AP-1 hatása szintén nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva.<sup>254</sup>

Az állatkísérleteinkben talált elváltozásokat sejteken végzett vizsgálatokkal igyekeztünk érthetővé tenni. Simaizom sejteket Spi-vel előinkubálva gátoltuk az Ang-kiváltotta ERK 1/2 foszforilációt, valamint az elhúzódó NAD(P)H oxidáz anzim-aktivitást. Ez a talán meglepő eredmény arra enged következtetni, hogy az Ang hatását már nagyon korán gátolhatjuk MR-blokkolóval, mégpedig az EGFR aktiválódása előtt. Ennek tisztázására további kísérletek szükségesek.

A fenti eredmények azt igazolják, hogy megfelelő érvédelem eléréséhez nem elégséges az AT<sub>1</sub> receptor hatásának kivédése, hanem szükséges az Ald hatásának gátlása is.<sup>255</sup>

### **6.6. A hőkezelt, magas fehérjetartalmú ételek szérum-AGE-szintre és az albuminuriára kifejtett hatásának vizsgálata egészséges önkénteseken.**

McCance és munkatársai már az előző évtized elején kimutatták, hogy az arginin lizinnel való keresztkapcsolata pentozidin képződéséhez vezet.<sup>256</sup> Saját vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az arginin glikációja magas hőmérsékleten pirazil, vagy pirimidinil szabad gyök képződésével jár.<sup>257</sup> A keletkező szabad gyökök koncentrációja függ az inkubációs hőmérséklettől. Az arginint és glukózt tartalmazó oldatban magas hőmérsékleten keletkező szabad gyökök jelentőségét az adja, hogy hőkezelés (sütés, főzés) során az ételek szénhidrát és fehérje (vagy aminosav) tartalma között hasonló reakciók játszódhatnak le. Az így elkészített táplálékkal reaktív szabad gyökök és glikációs végtermékek juthatnak a szervezetbe. A szervezet fehérjeiben az évek során hőhatás nélkül is keletkeznek AGE-k.

Az in vitro előállított AGE-termékek elfogyasztását követően átmeneti szérum AGE-szint emelkedés és fokozott vizelet AGE ürítés figyelhető meg egészséges egyéneknél.<sup>82,83,258</sup> Egészséges patkányok táplálékába kevert AGE-termékek nem csak a szérumban és a vizeletben jelentek meg, hanem különböző szövetekben is akkumulálódtak.<sup>259,260</sup> A CML – mely egyben oxidatív marker is – koncentrációját, pl. amiloid- és neurodegeneratív plakkokban is igazolni lehetett. Vizsgálatunkban a magas protein tartalmú, hőkezelt (CML dús) diéta hatására szignifikánsan nőtt az éhgyomri szérum CML szint és a vizelettel ürített CML mennyisége is. Ugyan ismert, hogy szérumban levő CML 90%-a albuminhoz kötött formában található, a vizelet CML ürítés fokozódása nem az albumin ürítés fokozódásának következménye.<sup>261</sup>

Már 1975-ben felvetődött, hogy a vizeletből kimutatott CML bizonyos betegségek során keletkezik, amelynek azonban a táplálkozással való kapcsolatát elvetették. Liardon és mtsai

vetették fel a vizelettel ürülő CML összefüggését a diétával.<sup>262,80</sup> Szokásos hőkezelési eljárásokkal (sütés, főzés) elkészített magas fehérjetartalmú ételek fogyasztása magasabb CML bevitelt okoztak. A hőkezelés nélkül elkészített ételek (CML szegény diéta), annak ellenére, hogy fehérjetartalmuk magas volt, nem eredményeztek szérumban CML-szint emelkedést, sőt a vizelet CML ürítés csökkenését figyelhettük meg. Napjaink táplálkozási szokásait (átlagos fehérjebevitel, nyers és hőkezelt ételek együttes fogyasztása) megfigyelve, a CML bevitel mértéke a két vizsgálatunkban alkalmazott diéta között helyezkedik el. A szokásos táplálkozás során a CML bevitel alacsonyabb, mint a kizárólag hőkezelt ételekből álló, magas fehérjetartalmú diéta során, de magasabb, mint a kizárólag nyers ételekből álló fehérjeterhelés esetében.

A cukrok fehérjékkel és lipidekkel való reakciója során keletkező AGE termékek egyik legtöbbször vizsgált képviselője a CML.<sup>263</sup> Napjainkban végzett vizsgálatok igazolták, hogy a hagyományos sütéssel elkészített, széles körben elterjedt ételek CML tartalma legmagasabb a zsírban gazdag és legalacsonyabb a szénhidrátban gazdag ételek esetében.<sup>264</sup> A CML még mindig az egyik legszélesebb körben alkalmazott glicoxidációs marker. Az AGE szöveti akkumulációjának kimutatására használt poliklonális antitestek elsősorban a CML oldalláncukon keresztül ismerik fel a glikációs végtermékeket.<sup>265,266</sup> Számos szövetben sikerült igazolni az AGE termékek jelenlétét és felhalmozódását a CML kimutatásával, mint például az artériák falában, a vese glomerulusaiban, a tubuláris interstitiumban, a retina neurogliális és vascularis elemeiben, a szív szöveteiben, az aortabillentyűben, és az agy különböző szöveteiben.<sup>267,268,269,270,271,272,273</sup>

A CML és általában az AGE termékek jelenlétének és akkumulációjának jelentős patofiziológiai szerepe van. Az AGE termékek – közöttük a CML-tartalmú fehérjék - a RAGE-hoz kötődve számos folyamatot indukálnak. Számos gyulladáscsökkentő citokin (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8, VEGF) képződésének indukálása által felelőssé tehetőek a diabetesben tapasztalható érkárosodás kialakulásáért.<sup>274</sup> Ezen túl igazolták, hogy szabályozott sejthalált képesek indukálni proapoptotikus gének aktiválásán keresztül (caspase-3, -8, -9).<sup>275</sup> A simaizom sejtek proliferációjában fontos szerepet betöltő ERK1/2 és p38 - MAP kinázok - foszforilációját indukálva – szabad gyökös mehanizmuson keresztül - fokozzák az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktivitását.<sup>276,277,278</sup> A fentiek alapján érthető az atherosclerosis kialakulásában betöltött szerepük vizsgálata. Jelenlétüket már az előző évtized elején sikerült igazolni atheroscleroticus plakkokban. Stitt és mtsai igazolták, hogy az arteriolák



falában extracellulárisan található AGE-kollagén mellett az AGE-ApoB – melynek szintje korrelál a már régóta ismert AGE-kollagénével – elsősorban a lipideket bekebelező habos sejtekben intracellulárisan található a nem diabeteses, normál lipid szinttel rendelkező, okkluzív atherosclerosisban szenvedő egyéneknél.<sup>279,280</sup> Napjainkban mutatták ki, hogy képződésüket gátolva az atheroscleroticus plakk mérete jelentősen csökkenthető.<sup>281</sup>

A kreatinin clearance nem változott az AGE-termékekben gazdag táplálék hatására összehasonlítva az AGE szegény diétát fogyasztók kreatinin clearancevel, azonban az AGE gazdag diéta megnövelte a vizelet albuminürítést. Megnövekedett filtrációja során az albumint elsősorban a cubulin és megalin receptorok segítségével abszorbeálják a proximális tubuláris sejtek.<sup>282</sup> Az albumin ezt követően az AP-1 transzkripciós faktoron keresztül a TGF- $\beta$  II típusú receptorának expresszióját stimulálja, involválva az autokrin, parakrin renin-angiotenzin rendszert is.<sup>283</sup> Rövid ideig tartó vizsgálatunkkal nem tudtuk igazolni a TGF- $\beta$  magasabb szintjét az AGE-gazdag diétát fogyasztó önkéntesek szérumban (ábrán nem mutatott eredmény). Az albumin az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációján keresztül számos gyulladáscsökkentő citokin, köztük az IL-8, képződését stimulálja a proximális tubuláris sejtekben, valamint az MCP-1 expresszióján keresztül a monociták toborzásában vesz részt.<sup>284,285</sup> A tubuláris sejtek aktivációja maga után vonja, többek között a már említett citokinek aktiválásán keresztül, a vese fibrózisának kialakulását.<sup>286</sup> A fentiek alapján egyértelmű, hogy vesebetegségek nem specifikus kezelésének fontos eleme a fehérjebevitel mérséklése, ugyanis a tapasztalatok szerint a proteinbevitel korlátozása lassítja a vesebetegség progresszióját, mind diabeteses, mind nem diabeteses vesebetegségekben.<sup>287</sup> Diabeteses nephropathiás betegekben alacsonyabb proteinbevitel mellett a GFR csökkenés üteme lassítható, az albuminuria mértéke csökkenthető.<sup>288,289</sup> Vizsgálatunkban csak az AGE-termékekben gazdag proteinterhelés váltott ki albuminuria növekedést, az AGE szegény proteinterhelés nem, ami arra utal, hogy a proteinterhelés albuminuriát okozó hatásának fontos összetevője lehet az ételből származó AGE. Erre utal Yamagishi és mtsainak vizsgálata is, melyben igazolták, hogy az AGE-k TGF- $\beta$  expresszióját indukálják a proximális tubuláris sejtekben.<sup>290</sup> Mivel az ételek elkészítésekor a fehérjéket általában jelentős hőhatás éri, a magas protein tartalmú, szokásos módon elkészített ételekben fokozott AGE-képződéssel kell számolni.

Végeredményként elmondhatjuk, hogy a szérumban és a vizeletben az AGE szintek táplálkozási szokásainktól is függenek. A hőkezelt ételek, magas AGE tartalmuknál fogva,

a keringő és a filtrált glikációs végtermékek fontos forrásai. Különösen kedvezőtlen lehet a táplálékkal bevitt AGE-k hatása a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben, mivel esetükben az AGE-termékek vesén keresztül történő eliminációja elégtelen.<sup>82</sup> A táplálékkal bevitt AGE-termékek káros hatásának ismeretében felmerül olyan konyhatechnikai elvek (túlzott hőkezelés kerülése, több nyers zöldség fogyasztása, sok zsírt tartalmazó ételek kerülése a táplálékok elkészítésekor, stb.) népszerűsítése, melyek esetén kevesebb AGE keletkezik. Nem utolsó sorban, a krónikus veseelégtelenségben szenvedő, illetve a romló vesefunkciójú cukorbetegség esetében fontos lehet az AGE-szegény diéta alkalmazása.

## 7. TÉZISEK

- I. Az MG fokozza a szabadgyök-képződést, csökkenti az alacsony molekulású thiol-tartalmú vegyületek koncentrációját és intracelluláris kalcium akkumulációjához vezet izolált humán vörösvértestekben. Az MG hatására a ferri ion ferro ionná redukálódik.
- II. A dohányfüst idő- és koncentrációfüggően gátolja a bradikinin kiváltotta kalcium beáramlást. A dohányfüst nagy mennyiségű formaldehidet tartalmaz, mely szintén koncentrációfüggően gátolja a bradikinin kiváltotta kalcium beáramlást. A dohányfüst és a formaldehid hatás a redukált glutationnal kivédhető volt. A dohányfüst csökkentette a sejtek GSH és fehérje-thiol tartalmát. A formaldehidnél nem volt megfigyelhető ilyen hatás.
- III. Az Ald nem-transzkripcióssal, időfüggően aktiválja a simaizom sejtek ERK 1/2 és JNK kinázait. Az Ald-kiváltotta ERK 1/2 és JNK aktiválás szabadgyök-függő.
- IV. Az Ang-kiváltotta MAP kináz foszforiláció Ald-dal fokozható volt. Az Ald által fokozott Ang-indukálta MAPK foszforiláció szabadgyök-függő.
- V. Az Ang-indukálta MAPK foszforiláció Ald hatása által történő fokozódása a nukleáris transzkripcióssal faktorok (NF- $\kappa$ B, AP-1) szintjén is kimutatható.
- VI. A Spi csökkenti az Ang-indukálta ERK 1/2 foszforilációt. A Spi csökkenti az Ang-kiváltotta szabadgyök-képződést.
- VII. A MR-gátló Epl csökkenti a vesében és a szívben kialakuló fibrózis mértékét, az albuminuriát, javítja a diasztolés diszfunkció és a szív hipertrófiás indexének mértékét dTGR patkányokban. Az Epl csökkenti a szöveti ERK 1/2 foszforiláltsági szintjét dTGR patkányokban.
- VIII. A magas fehérjetartalmú, nyers ételek CML tartalma alacsony, ezek fogyasztása csökkenti a vizelettel ürülő CML mennyiségét.
- IX. A magas fehérjetartalmú, hőkezelt ételek fogyasztása fokozott CML bevitelt jelent, hatásukra megnő a szérum CML szint és a vizelet CML ürítés.
- X. A magas fehérjetartalmú, hőkezelt, CML-dús ételek hatására nő a vizelet-albuminürítés.

## 8. A szerző értekezéssel kapcsolatos publikációinak jegyzéke

### Közlemények

#### Angol nyelven

1. Zoltán Wagner, István Wittmann, **István Mazák**, Reinhard Schinzel, August Heidland, Rosemaire Kientsch-Engel, Judit Nagy: N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 785-91.
2. István Wittmann, **István Mazák**, László Pótó, Zoltán Wagner, László Wagner, Tibor Vas, Tibor Kovács, József Belágyi, Judit Nagy: Role of iron in the interaction of red blood cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling. *Chem Biol Interact.* 2001; 138: 171-87.
3. **István Mazák**, István Wittmann, László Wagner, Zoltán Wagner, Péter Degrell, Tibor Vas, Gergő A. Molnár, Judit Nagy: Cigarette smoke and its formaldehyde component inhibit bradykinin-induced calcium increase in pig aortic endothelial cells. *Endothelium* 2002; 9: 103-108.
4. **István Mazák**, Anette Fiebeler, Dominik N. Müller, Joon-Keun Park, Erdenechimeg Shagdarsuren, Carsten Lindschau, Ralf Dechend, Christiane Viedt, Bernhard Pilz, Herman Haller, Friedrich C. Luft: Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004; 109: 2792-2800.

#### Magyar nyelven

5. Wittmann István, Wagner Zoltán, Wagner László, **Mazák István**, Nagy Judit: A nem-enzimatis glikáció szerepe az öregedés, az atherosclerosis és a diabeteses nephropathia pathophysiológiájában és klinikai képeznek kialakulásában. *Diabetologia Hungarica* 7: 9-21, 1999
6. Wittmann István, Wagner Zoltán, Pótó László, Wagner László, **Mazák István**, Nagy Judit: Karbonil stressz-metabolitok kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. *Orvosi Hetilap* 33: 1841-1845, 1999

7. Wittmann István, Wagner Zoltán, Pótó László, Wagner László, **Mazák István**, Nagy Judit: Glikációs végtermékek kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. Orvosi Hetilap 36: 1997-2001, 1999
8. **Mazák István**, Wittmann István, Wagner Zoltán, Wagner László, Nagy Judit: A dohányfüst gátolja a bradikinin kiváltotta kalcium-beáramlást az endothel sejtekben. Hypertonia és Nephrologia 4: 37-41, 2000
9. Wittmann István, Wagner László, Pótó László, Wagner Zoltán, **Mazák István**, Nagy Judit: Kismolekulasúlyú karbonil stressz-termékek kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. Magyar Belorvosi Archivum 1: 49-54, 2000
10. Wittmann István, Degrell Péter, Komáromy Anette, Molnár Gergő Attila, Wagner Zoltán, Wagner László, **Mazák István**, Nagy Judit: Role of the renin-angiotenzin system in the pathogenesis, clinical picture and treatment of diabetic nephropathy. Orvosi Hetilap 144(13): 613-9, 2003

### **Kongresszusi absztraktok**

#### **Angol nyelven**

11. **István Mazák**, István Wittmann, László Wagner, Zoltán Wagner, Judit Nagy: Smoke inhibits bradykinin-induced calcium influx in endothelial cells. Nephrol Dial Transplant 1999; 14: A10.
12. István Wittmann, Zoltán Wagner, László Pótó, László Wagner, **István Mazák**, Judit Nagy: Carbonyl stress products in the urine of diabetic patients. Nephrol Dial Transplant 1999; 14: A106.
13. Zoltán Wagner, István Wittmann, László Pótó, László Wagner, **István Mazák**, Judit Nagy: Detection of methylglyoxal adducts in the urine of diabetic patients. Diabetologia 1999; 42 (Suppl.1): A328.
14. **István Mazák**, István Wittmann, László Wagner, Zoltán Wagner, Judit Nagy: Smoke inhibits bradykinin-induced calcium influx in endothelial cells. Cigarette-smoking and kidney involvement, 1999, Milano

15. **István Mazák**, István Wittmann, Zoltán Wagner, László Wagner, Tibor Vas, Judit Nagy: Methylglyoxal evokes oxidative stress and calcium accumulation in red blood cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108: A6, 2000 (IF: 1,406)
16. Zoltán Wagner, István Wittmann, **István Mazák**, Tibor Vas, László Wagner, Judit Nagy: Comparison of pyrimidine-like molecules as carbonyl stress products in diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: A13.
17. István Wittmann, László Wagner, László Pótó, Zoltán Wagner, **István Mazák**, Tibor Vas, Judit Nagy: Low molecular weight carbonyl stress-products in the urine of diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: A13.
18. **István Mazák**, István Wittmann, Zoltán Wagner, László Wagner, Tibor Vas, Judit Nagy: Methylglyoxal produced in non-enzymatic glycation evokes oxidative stress and calcium accumulation in human red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: A103.
19. Zoltán Wagner, István Wittmann, **István Mazák**, Tibor Vas, László Wagner, Judit Nagy: Comparison of pyrimidine-like molecules as carbonyl stress products in patients with diabetes mellitus and azotemia. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: A104.
20. István Wittmann, László Wagner, László Pótó, Zoltán Wagner, **István Mazák**, Tibor Vas, Judit Nagy: Analysis of low molecular weight carbonyl stress-products in the urine of patients with diabetes mellitus using the lowry method. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: A104.
21. **István Mazák**, István Wittmann, László Pótó, Zoltán Wagner, Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, József Belágyi, Judit Nagy: Role of iron and methylglyoxal in diabetic nephropathy. In vitro study using red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: A74.
22. István Wittmann, Zoltán Wagner, **István Mazák**, László Pótó, Reinhard Schinzel, August Heidland, Judit Nagy: Foods rich in advanced glycation end products (AGEs) induce microalbuminuria in healthy persons. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: A106.
23. Zoltán Wagner, István Wittmann, **István Mazák**, László Pótó, Veronika Faist, Reinhard Schinzel, August Heidland, Judit Nagy: Effects of dietary carboxymethyllysine (CML) intake on CML levels and albumin excretion rates in healthy subjects. *Diabetologia* 2001; 44 (Suppl.1): A318.

24. **István Mazák**, Anette Fiebeler, Dominik N. Müller, Joon-Keun Park, Erdenechimeg Shagdarsuren, Carsten Lindschau, Ralf Dechend, Bernhard Pilz, Hermann Haller, Friedrich C. Luft: Aldosterone potentiates angiotenzin II-induced MAP Kinase signaling in vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (Suppl. 4): 12.
25. Zoltán Wagner, Péter Degrell, Tibor Vas, László Wagner, **István Mazák**, Gergő Molnár, Boglárka Laczy, Judit Nagy, István Wittmann: Carbonyl stress in vitro induces dysmorphic red blood cell formation seen in glomerular haematuria. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (Suppl. 4): 640-641.
26. Anette Fiebeler, **István Mazák**, Dominik N Müller, Carsten Lindschau, Herman Haller, Friedrich Luft: Aldosterone induced non-transcriptional signaling in vascular smooth muscle cells. 29<sup>th</sup> International Aldosterone Conference, Philadelphia, USA, 2003

### **Magyar nyelven**

27. Wittmann István, Póto László, Tóth Gábor, Wagner Zoltán, Wagner László, **Mazák István**, Nagy Judit. A glikációs végtermékek vizelettel történő, vesefunkciófüggő eliminációja diabetesben. *Hypertonia és Nephrologia* 3 (Suppl.2): 87, 1998
28. Wagner Zoltán, Wittmann István, **Mazák István**, Schinzel Reinhard, Heidland August, Kientsch-Engel Rosemarie, Nagy Judit. A szérum N<sup>ε</sup>-karboximetil-lizin (CML) szint és a vizelet CML ürítés összefüggése a vesefunkcióval 2-es típusú diabetes mellitusban. *Magyar Belorvosi Archivum* (Suppl.2): 76, 2001
29. **Mazák István**, Wittmann István, Wagner Zoltán, Póto László, Faist Veronika, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. Hőkezelt ételek fogyasztásának hatása a glikációs végtermékek szérumszintjére és vizeletürítésére, valamint az albuminuriára. *Magyar Belorvosi Archivum* (Suppl.2): 78, 2001

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ganten D, Wagner J, Zeh K, Bader M, Michel JB, Paul M, Zimmermann F, Ruf P, Hilgenfeldt U, Ganten U, Kaling M, Bachmann S, Fukamizu A, Mullins JJ, Murakami K: Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89: 7806-7810
2. Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H: Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999, 33: 212-218
3. Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Muller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC: Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2001, 37: 414-418
4. Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC: Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003, 14: S254-258
5. Acheson RM: The Discovery of Free Radicals. *Journal of Chemical Education* 1996, 73: 32
6. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB: Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. 2003, 87: 386-394
7. Commoner B, Townsend J, Pakje GE: Free radicals in biological materials. *Nature* 1954, 174: 689-691
8. Blum HF, Loos GM, Price JP, Robinson JC: Enhancement by visible light of recovery from ultra-violet irradiation in animal cells. *Nature* 1949, 164: 1011.
9. Haber F, Weiss J: Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* 1932, 51: 948-950
10. Haber F, Weiss J: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London* 1934, 147: 332-351
11. Mittal CK, Murad F: Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74: 4360-4364
12. Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA: The sources of oxidative stress in the vessel wall. *Kidney International* 2005, 67: 1659-1661
13. Babior BM: NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999, 93: 1464-1476
14. Cross AR, Curnutte JT: The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 6543-6548
15. Lassegue B, Clempus RE: Vascular NAD(P)H oxidases specific features, expression and regulation. *American journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2003, 285: R277-297
16. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H: Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 2001, 104: 1767-1772
17. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM: Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000, 20: 1903-1911
18. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS: Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47 (phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274: 19814-19822
19. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 23317-23321
20. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL: Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation Research* 2002, 90: 1205-1213
21. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H: The adaptor protein p40 (phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *The European Molecular Biology Organization Journal* 2002, 21: 6312-6320
22. Touyz RM, Schiffrin EL: Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *Journal of Hypertension* 2001, 19: 1245-1254



23. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK: Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circulation Research* 2002, 91: 406-413
24. Touyz RM, Schiffrin EL: Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999, 34: 976-982
25. Holland JA, Mayer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM: Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* 1998, 6: 113-121
26. Yi F, Zhang AY, Janscha JL, Li PL, Zou AP: Homocysteine activates NADH/NADPH oxidase through ceramide-stimulated Rac GTPase activity in rat mesangial cells. *Kidney International* 2004, 66: 1977-1987
27. Quilliam LA, Mueller H, Bohl BP, Prossnitz V, Sklar LA, Der CJ, Bokoch GM: Rap1A is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils. *The Journal of Immunology* 1991, 11: 1523-1530
28. Zhao X, Carnevale KA, Cathcart MK: Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278: 40788-40792
29. Vecchione C, Brandes RP: Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circulation Research* 2002, 91: 173-179
30. Werner E, Werb Z: Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *The Journal of Cell Biology* 2002, 158: 357-368
31. Poole LB, Ellis HR: Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase. *Methods in Enzymology* 2002, 348: 122-136
32. Denu JM, Tanner KG: Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 1998, 37: 5633-5642
33. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG: Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 273: 15366-15372
34. Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG: Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 10527-10531
35. Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL: Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Hypertension* 2004, 22: 1141-1149
36. Shaulian E, Karin M: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* 2002, 4: E131-136
37. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC: NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000, 35: 193-201
38. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA: Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radical Biology and Medicine* 2000, 28: 1317-1327
39. Mates JM: Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000, 153: 83-104
40. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *The Journal of Biological Chemistry* 1969, 244: 6049-6055
41. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL: The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995, 15: 2032-2036
42. Fukui T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG: Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circulation Research* 1999, 85: 23-28
43. Fukui T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG: Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *The Journal of Clinical Investigation* 2000, 105: 1631-1639
44. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics* 1995, 11: 376-381
45. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM: Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93: 9782-9787
46. Zamocky M, Koller F: Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 1999, 72: 19-66

47. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H: The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2003, 57: 145-155
48. Mannervik B: The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochemical Society transactions* 1987, 15: 717-718
49. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 1999, 32: 595-603
50. Levin ML, Goldstein H, Gerhardt PR: Cancer and tobacco smoking; a preliminary report. *The Journal of the American Medical Association* 1950, 143: 336-338
51. Pryor WA, Stone K: Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993, 686: 12-27
52. Lyons MJ, Gibson JF, Ingram DJ: Free-radicals produced in cigarette smoke. *Nature* 1958, 181: 1003-1004
53. Roemer E, Stabbert R, Rustemeier K, Veltel DJ, Meisgen TJ, Reininghaus W, Carchman RA, Gaworski CL, Podraza KF: Chemical composition, cytotoxicity and mutagenicity of smoke from US commercial and reference cigarettes smoked under two sets of machine smoking conditions. *Toxicology* 2004, 195: 31-52
54. Smith CJ, Fischer TH: Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001, 158: 257-267
55. Zhang D, Tao Y, Gao J, Zhang C, Wan S, Chen Y, Huang X, Sun X, Duan S, Schonlau F, Rohdewald P, Zhao B: Pycnogenol in cigarette filters scavenges free radicals and reduces mutagenicity and toxicity of tobacco smoke in vivo. *Toxicology and Industrial Health* 2002, 18: 215-224
56. Pryor WA, Prier DG, Church DF: Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environmental Health Perspectives* 1983, 47: 345-355
57. Steenland K, Thun M, Lally C, Heath C Jr: Environmental tobacco smoke and coronary heart disease in the American Cancer Society CPS-II cohort. *Circulation* 1996, 94: 622-628
58. Herbert WH: Cigarette smoking and arteriographically demonstrable coronary artery disease. *Chest* 1975, 67: 49-52
59. Waters D, Lesperance J, Gladstone P, Bocuzzi SJ, Cook T, Hudgin R, Krip G, Higginson L: Effects of cigarette smoking on the angiographic evolution of coronary atherosclerosis. A Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (CCAIT) Substudy. CCAIT Study Group. 1996, 94: 614-621
60. Celermajor DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE: Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adult. *The New England Journal of Medicine* 1996, 334: 150-154
61. Ota Y, Kugiyama K, Sugiyama S, Ohgushi M, Matsumura T, Doi H, Ogata N, Oka H, Yasue H: Impairment of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract--role of free radicals and attenuation by captopril. *Atherosclerosis* 1997, 131: 195-202
62. Jaimes EA, DeMaster EG, Tian RX, Raj L: Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004, 24: 1031-1036
63. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxyxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 87: 1620-1624
64. Wittmann I, Koszegi T, Wagner L, Wagner Z, Mazak, Nagy J: Insulin-induced peroxyxynitrite production in human platelet-rich plasma. *Redox Report* 2001, 6: 251-255
65. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM: Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *The American Journal of Cardiology* 2002, 89: 1117-1119
66. Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD: Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 1994, 160: 154-162
67. Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK: Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 1996, 270: 1624-1633
68. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE: Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *British Medical Journal* 1989, 298: 784-788
69. Reaven G, Tsao PS: Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: the key player between cigarette smoking and cardiovascular disease? *Journal of the American College of Cardiology* 2003, 41: 1044-1047
70. Yamaguchi Y, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M: Evidence of modified LDL in the plasma of hypercholesterolemic WHHL rabbits injected with aqueous extracts of cigarette smoke. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2000, 8: 255-260

71. Monnier VM, Cerami A: Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981, 211: 491-493
72. Glomb MA, Tschirnich R: Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49: 5543-5550
73. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS: Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochemical Journal* 1999, 344: 109-116
74. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C: Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *Journal of the American Society of Nephrology* 2000, 11: 1744-1752
75. Ahmed N: Advanced glycation endproducts - role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005, 67: 3-21
76. Nicholl ID, Bucala R: Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell and Molecular Biology* 1998, 44: 1025-1033
77. O'Brien J, Morrissey PA: Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1989, 28: 211-248
78. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A: Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 1997, 94: 13915-13920
79. Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB, Bucala R: Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Molecular Medicine* 1998, 4: 594-601
80. Liardon R, Weck-Gaudard D, Philippossian G, Finot P: Identification of N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine: A New Maillard Reaction Product, in Rat Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1987, 35: 427-431
81. Erbersdobler HF: Protein reactions during food processing and storage – their relevance to human nutrition, in Somogyi JC and Müller HR (eds): *Nutritional impact of food processing*. *Bibl Nutr Dieta* N° 43. Basel, Karger, pp 140-154, 1989
82. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T: Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94: 6474-6479
83. He C, Sabol J, Mitsuhashi T, Vlassara H: Dietary glycotoxins. Inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes* 1999, 48: 1308-1315
84. Vlassara H, Bucala R: Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: Role of advanced glycation end product receptors. *Diabetes* 1996, 45 (Suppl.3): S65-S66
85. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, Ypersele de Strihou C, Kurokawa K: Renal catabolism of advanced glycation end products: The renal fate of pentosidine. *Kidney International* 1998, 53: 416-422
86. Gugliucci A, Bendayan M: Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* 1996, 39: 149-160
87. Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H: Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation end product receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80 K-H membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93: 11047-11052
88. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Claus M: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of Biological Chemistry* 1992, 267: 14987-14997
89. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, vanBerkel TJC, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997, 386: 292-296
90. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H: CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001, 947: 350-355
91. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1992, 267: 14998-15004
92. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular

- oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 269: 9889-9897
93. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL: Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2001, 280: E685-694
  94. Simm A, Munch G, Seif F, Schenk O, Heidland A, Richter H, Vamvakas S, Schinzel R: Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 1997, 410: 481-484
  95. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H: Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274: 19919-19924
  96. Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R: Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002, 105: 816-822
  97. Andrews NC: Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine* 1999, 341: 1986-1995
  98. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI: Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000, 403: 776-781
  99. Emerit J, Beaumont C, Trivin F: Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2001, 55: 333-339
  100. Wolf SP: Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British Medical Bulletin* 1993, 49: 642-652
  101. Shah S: Role of iron in progressive renal disease. *American Journal of Kidney Disease* 2001, 37(Suppl.2): S30-S33
  102. Delanghe JR, Langlois MR, Boelaert JR, Van Acker J, Van Wanzelee F, van der Groen G, Hemmer R, Verhofstede C, De Buyzere M, De Bacquer D, Arendt V, Plum J: Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. *AIDS* 1998, 12: 1027-1032
  103. Smith BC, Gorve J, Guzail MA, Day CP, Daly AK, Burt AD, Bassendine MF: Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998, 27: 1695-1699
  104. Riera A, Gimferrer E, Cadafalch J, Remacha A, Martin S: Prevalence of high serum and red cell ferritin levels in HIV-infected patients. *Hematologica* 1994, 79: 165-167
  105. Puntarulo S, Cederbaum AI: Role of cytochrom P-450 in the stimulation of microsomal production of reactive oxygen species by ferritin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996, 1289: 238-246
  106. Elgawish A, Glomb M, Friedlander M, Monnier VM: Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 12964-12971
  107. Clapham DE: Calcium signaling. *Cell* 1995, 80: 259-268
  108. Ward DT: Calcium receptor-mediated intracellular signaling. 2004, 35: 217-228
  109. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL: Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Current Biology* 2002, 12: R563-R565
  110. Hanson CJ, Bootman MD, Roderick HL: Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Current Biology* 2004, 14: R933-935
  111. Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F, Raeymaekers L, Nilius B, Eggermont J, De Smedt H: Abnormal intracellular Ca(2+)homeostasis and disease. *Cell Calcium* 2000, 28: 1-21
  112. Nilius B, Droogmans G: Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiological Reviews* 2001, 81: 1415-1459
  113. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J: Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews* 1994, 74: 595-636
  114. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, Pozzan T: Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 2003, 22: 8619-8627
  115. Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R: The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal* 1998, 17: 5298-5308
  116. Fleming I, Busse R: Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2003, 284: R1-12

117. Shaul PW: Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annual Review of Physiology* 2002, 64: 749-774
118. Lane P, Gross SS: The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Acta Physiologica Scandinavica* 2000, 168: 53-63
119. Brecht DS, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* 1994, 63: 175-195
120. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T: Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by  $Ca^{2+}$ -calmodulin and caveolin. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272: 15583-15586
121. Ignarro LJ: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *The FASEB Journal* 1989, 3: 31-36.
122. Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL: Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 1985, 313: 310-313
123. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D: Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine* 2001, 79: 76-102
124. Touyz RM, Berry C: Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002, 35: 1001-1015
125. Hunyady L, Gaborik Z, Shah BH, Jagadeesh G, Clark AJ, Catt KJ: Structural determinants of agonist-induced signaling and regulation of the angiotensin AT1 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004, 217: 89-100
126. Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ: Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279: 35518-35525
127. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The New England Journal of Medicine* 1999, 341: 709-717
128. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleiman J: The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. *Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. Cardiovascular Drugs and Therapy* 2001, 15: 79-87
129. Connell JM, Fraser R, MacKenzie SM, Friel EC, Ingram MC, Holloway CD, Davies E: The impact of polymorphisms in the gene encoding aldosterone synthase (CYP11B2) on steroid synthesis and blood pressure regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004, 217: 243-247
130. Williams GH: Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Failure Reviews* 2005, 10: 7-13
131. Bhargava A, Pearce D: Mechanisms of mineralocorticoid action: determinants of receptor specificity and actions of regulated gene products. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004, 15: 147-153
132. Falkenstein E, Christ M, Feuring M, Wehling M: Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney International* 2000, 57: 1390-1394
133. Moura AM, Worcel M: Direct action of aldosterone on transmembrane  $22Na$  efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 1984, 6: 425-430
134. Petzel D, Ganz MB, Nestler EJ, Lewis JJ, Goldenring J, Akcicek F, Hayslett JP: Correlates of aldosterone-induced increases in  $Ca^{2+}$  and  $I_{sc}$  suggest that  $Ca^{2+}$  is the second messenger for stimulation of apical membrane conductance. *The Journal of Clinical Investigation* 1992, 89: 150-156
135. Wehling M, Spes CH, Win N, Janson CP, Schmidt BM, Theisen K, Christ M: Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998, 83: 3517-3522
136. Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M: Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 204: 475-481
137. Alzamora R, Michea L, Marusic ET: Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 2000, 35: 1099-1104
138. Gekle M, Freudinger R, Mildnerberger S, Silbernagl S: Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 2002, 282: F669-679
139. Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park JK, Shagdarsuren E, Lindschau C, Dechend R, Viedt C, Pilz B, Haller H, Luft FC: Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004, 109:2792-2800
140. Klein K, Henk W: Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blood coagulation. *Zeitschrift für Kreislaufforschung* 1963, 52: 40-53

141. Schmidt BMW, Montealegre A, Janson CP, Martin N, Stein-Kemmesies C, Scherhag A, Feuring M, Christ M, Wehling M: Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999, 84: 3528-3533
142. White PC, Mune T, Agarwal AK: 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine Reviews* 1997, 18: 135-156
143. Pearce D, Bhargava A, Cole TJ: Aldosterone: its receptor, target genes, and actions. *Vitamins and Hormones* 2003, 66: 29-76
144. Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988, 240: 889-895
145. Bhargava A, Pearce D: Mechanisms of mineralocorticoid action: determinants of receptor specificity and actions of regulated gene products. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004, 15: 147-153
146. Tallec LP, Kirsh O, Lecomte MC, Viengchareun S, Zennaro MC, Dejean A, Lombes M: Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Molecular Endocrinology* 2003, 17: 2529-2542
147. Snyder PM, Olson DR, Thomas BC: Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 5-8
148. Verrey F, Pearce D, Pfeiffer R, Spindler B, Mastroberardino L, Summa V, Zecevic M: Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. *Kidney International* 2000, 57: 1277-1282
149. Rocha R, Stier CT Jr, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK: Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000, 141: 3871-3878
150. Dzau VJ: Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 1988, 77: 14-13
151. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP: Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circulation Research* 1992, 71: 503-510
152. Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP: Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 1995, 92: 175-182
153. Young MJ, Funder JW: Mineralocorticoids, salt, hypertension: effects on the heart. *Steroids* 1996, 61: 233-235
154. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C: Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. *Physiological regulation. The Journal of Biological Chemistry* 1998, 273: 4883-4891
155. Duprez DA, Bauwens FR, De Buyzere ML, De Backer TL, Kaufman JM, Van Hoecke J, Vermeulen A, Clement DL: Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *The American Journal of Cardiology* 1993, 71: 17A-20A
156. Oshima Y, Fujio Y, Funamoto M, Negoro S, Izumi M, Nakaoka Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kawase I: Aldosterone augments endothelin-1-induced cardiac myocyte hypertrophy with the reinforcement of the JNK pathway. *FEBS Letters* 2002, 524: 123-126
157. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, D'Adamo F, Riccardi C: Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 2001, 98: 743-753
158. Mittelstadt PR, Ashwell JD: Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 29603-29610
159. Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC, Lombes M: Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 38911-38920
160. Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ, Funder JW, McMahon EG: Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circulation Research* 2003, 93: 69-76
161. Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* 2001 81: 807-869
162. Hagan S, Garcia R, Dhillon A, Kolch W: Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods in Enzymology* 2005, 407: 248-259
163. Downward J: Control of ras activation. *Cancer Surveys* 1996, 27: 87-100
164. Sasaoka T, Langlois WJ, Leitner JW, Draznin B, Olefsky JM: The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 269: 32621-32625
165. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL: Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* 1999, 79: 143-180

166. Renshaw MW, Toksoz D, Schwartz MA: Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 21691-21694
167. Abe J, Kusuvara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD: Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 16586-16590
168. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD: BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO Journal* 1997, 16: 7054-7066
169. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD: Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 1998, 395: 713-716
170. Liang Q, Molkentin JD: Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003, 35: 1385-1394
171. Waetzig V, Herdegen T: A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278: 567-572
172. Huang C, Jacobson K, Schaller MD: MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science* 2004, 117: 4619-4628
173. Theodosiou A, Ashworth A: MAP kinase phosphatases. *Genome Biology* 2002, 3: reviews 3009.1-3009.10
174. Leoncini G, Signorello MG, Piana A, Carrubba M, Armani U: Hyperactivity and increased hydrogen peroxide formation in platelets of NIDDM patients. *Thrombosis Research* 1997, 86: 153-160
175. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry* 1985, 265: 3440-3450
176. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA: Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic retina: effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid. *European Journal of Pharmacology* 2000, 398: 139-146
177. Yim HS, Kang SO, Hah YC, Chock PB, Yim MB: Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 28228-28232
178. Elliott SJ, Eskin SG, Schilling WP: Effect of t-butyl-hydroperoxide on bradykinin-stimulated changes in cytosolic calcium in vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1989, 264: 3806-3810
179. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951, 193: 265-275.
180. Haller H, Quass P, Lindschau C, Luft FC, Distler A: Platelet-derived growth factor and angiotensin II induce different spatial distribution of protein kinase C- $\alpha$  and - $\beta$  in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1994, 23: 848-852
181. Ohba M, Shibamura M, Kuroki T, Nose K: Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor- $\beta$  1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *The Journal of Cell Biology* 1994, 126: 1079-1088
182. Nakayama M, Izumi G, Nemoto Y, Shibata K, Hasegawa T, Numata M, Wang K, Kawaguchi Y, Hosoya T: Suppression of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine generation by the antioxidant N-acetylcysteine. *Peritoneal Dialysis International* 1999, 19: 207-210
183. Erbersdobler HF, Hupe A: Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* 1991, 30: 46-49
184. Hartkopf J, Erbersdobler HF: Model experiments of the formation of N epsilon-carboxymethyllysine in food products. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und forschung* 1994, 198: 15-19
185. Hartkopf J, Erbersdobler HF: Experiments with sausage meat on the formation of N epsilon-carboxymethyllysine. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und forschung* 1995, 201: 27-29
186. Drusch S, Faist V, Erbersdobler HF: Determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chemistry* 1999, 65: 547-552
187. Erbersdobler HF, Faist V: Metabolic transit of Amadori products. *Nahrung* 2001, 45: 177-181
188. Mellinghoff AC, Reininger AJ, Wuerth JP, Founds HW, Landgraf R, Hepp KD: Formation of plasma advanced glycation end products (AGEs) has no influence on plasma viscosity. *Diabetic Medicine* 1997, 14: 832-836
189. Baynes JW, Thorpe SR: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999, 48: 1-9
190. Wang X, Desai K, Chang T, Wu L: Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *Journal of hypertension* 2005, 23: 1565-1573
191. Mooradian AD, Lung CC, Pinnas JL: Glycosylation enhances malondialdehyde binding to proteins. *Free radical biology & medicine* 1996, 21: 699-701
192. Zoppini G, Targher G, Monauni T, Faccini G, Pasqualini E, Martinelli C, Zenari ML, Muggeo M:



- Increase in circulating products of lipid peroxidation in smokers with IDDM. *Diabetes Care* 1996, 19: 1233-1236
193. Odani H, Shinzato T, Matsumoto Y, Usami J, Maeda K: Increase in three alpha, beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1999, 256: 89-93
  194. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH: Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clinical Science*, 1994 87: 21-29
  195. Kalapos MP: Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology Letters* 1999, 110: 145-175
  196. Oya T, Hattory N, Mizuno Y, Miyata T, Maeda S, Osawa T, Uchida K: Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274: 18492-18502
  197. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y: Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *The Journal of Clinical Investigation* 1997, 99: 1272-1280
  198. Isom AL, Barnes S, Wilson L, Kirk M, Coward L, Darley-Usmar V: Modification of Cytochrome c by 4-hydroxy-2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2004, 15: 1136-1147
  199. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson JM: Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. *Biochemical Journal* 1993, 291: 529-535
  200. Hayase F, Shibuya T, Sato J, Yamamoto M: Effects of oxygen and transition metals on the advanced Maillard reaction of proteins with glucose. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1996, 60: 1820-1825
  201. Wang X, Yokoi I, Liu J, Mori A: Cobalt(II) and nickel(II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using electron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats. *Archives of biochemistry and biophysics* 1993, 306: 402-406
  202. Van Campenhout A, Van Campenhout C, Lagrou AR, Moorkens G, De Block C, Manuel-Y-Keenoy B: Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus. *Free radical biology & medicine* 2006, 40: 1749-1755
  203. Wittmann I, Mazak I, Poto L, Wagner Z, Wagner L, Vas T, Kovacs T, Belagy J, Nagy J: Role of iron in the interaction of red blood cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling. *Chemico-Biological Interactions* 2001, 138: 171-187
  204. Breuer W, Epsztejn S, Cabantchik ZI: Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 24209-24215
  205. Bryszewska M, Zavodnik IB, Niekurzak A, Szosland K: Oxidative processes in red blood cells from normal and diabetic individuals. *Biochemistry and molecular biology international* 1995, 37: 345-354
  206. Nagy J, Demaster EG, Wittmann I, Shultz P, Raj L: Induction of endothelial cell injury by cigarette smoke. *Endothelium* 1997, 5: 251-263
  207. Michelangeli F: The effects of amino acid-reactive reagents on the functioning of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium channel from rat cerebellum. *Cellular Signaling* 1993, 5: 33-39
  208. Koliwad SK, Kunze DL, Elliott SJ: Oxidant stress activates a non-selective cation channel responsible for membrane depolarization in calf vascular endothelial cells. *Journal of Physiology* 1996, 491: 1-12
  209. Elliott SJ, Koliwad SK: Oxidant stress and endothelial membrane transport. *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 19: 649-658
  210. Koliwad S.K., Kunze D.L., and Elliott S.J: Oxidant stress depolarizes calf pulmonary arterial endothelial cells by increasing cation permeability. *FASEB Journal* 1994, 8: A71.
  211. Yu PH.: Formation of cyanomethyl derivatives of basic amino acids and proteins with components in cigarette smoke. *Life sciences* 1988, 43: 1633-1641
  212. Mazak I, Wittmann I, Wagner L, Wagner Z, Degrell P, Vas T, Molnar GA, Nagy J: Cigarette smoke and its formaldehyde component inhibit bradykinin-induced calcium increase in pig aortic endothelial cells. *Endothelium* 2002, 9: 103-108
  213. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ: Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2003, 107: 2342-2347
  214. Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T: Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 14169-14175



215. Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T: Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 7957-1962
216. Eguchi S, Frank GD, Mifune M, Inagami T: Metalloprotease-dependent ErbB ligand shedding in mediating EGFR transactivation and vascular remodelling. *Biochemical Society Transactions* 2003, 31: 1198-1202
217. Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C: Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circulation Research* 2004, 94: 68-76
218. Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI: Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 2002, 106: 909-912
219. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1994, 74: 1141-1148
220. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ: Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997, 275: 1649-1652
221. Kimura S, Zhang GX, Nagai Y, Miyata K, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Fujisawa Y, Miyatake A, Abe Y: Time-dependent transition of tempol-sensitive reduction of blood pressure in angiotensin II-induced hypertension. *Journal of Hypertension* 2004, 22: 2161-2168
222. Wang D, Yu X, Brecher P: Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced activation of the calcium-sensitive tyrosine kinase proline-rich tyrosine kinase 2 without affecting epidermal growth factor receptor transactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274: 24342-24348
223. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW: Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001, 21: 489-495
224. Kayanoki Y, Higashiyama S, Suzuki K, Asahi M, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N: The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding EGF-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999, 259: 50-55
225. Rao GN: Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 1996, 13: 713-719
226. Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC: Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 11706-11712
227. Baas AS, Berk BC: Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1995, 77: 29-36
228. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T: Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertension Research* 2001, 24: 251-261
229. Shin EA, Kim KH, Han SI, Ha KS, Kim JH, Kang KI, Kim HD, Kang HS: Arachidonic acid induces the activation of the stress-activated protein kinase, membrane ruffling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via a small GTPase Rac1. *FEBS Letters* 1999, 452: 355-359
230. Griendling KK, Harrison DG: Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circulation Research* 1999, 85: 562-563
231. Duff JL, Berk BC, Corson MA: Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical And Biophysical Research Communication* 1992, 188: 257-264
232. Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M: Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1992, 71: 620-630
233. Krug AW, Schuster C, Gassner B, Freudinger R, Mildenerger S, Troppmair J, Gekle M: Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 45892-45897
234. Carpenter G: The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *BioEssays* 2000, 22: 697-707
235. Frank GD, Mifune M, Inagami T, Ohba M, Sasaki T, Higashiyama S, Dempsey PJ, Eguchi S: Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta. *Molecular and Cellular Biology* 2003, 23: 1581-1589

236. McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ: Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* 1998, 98: 2765-2773
237. Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, Park JK, Dechend R, Bieringer M, Shagdarsuren E, Breu V, Haller H, Luft FC: Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 2001, 37: 787-793
238. Muller DN, Mullally A, Dechend R, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Loffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aebi JD, Haller H, Luft FC: Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension* 2002, 40: 840-846
239. Gross V, Obst M, Kiss E, Janke J, Mazak I, Shagdarsuren E, Muller DN, Langenickel TH, Grone HJ, Luft FC: Cardiac hypertrophy and fibrosis in chronic L-NAME-treated AT2 receptor-deficient mice. *Journal of Hypertension* 2004, 22: 997-1005
240. Cooper ME: The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *American Journal of Hypertension* 2004, 17: 16S-20S.
241. Saito K, Ishizaka N, Aizawa T, Sata M, Iso-O N, Noiri E, Ohno M, Nagai R: Role of aberrant iron homeostasis in the upregulation of transforming growth factor-beta1 in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertension Research*, 2004, 27: 599-607
242. Trapp T, Holsboer F: Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends in Pharmacological Sciences* 1996, 17: 145-149
243. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT: Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1993, 25: 563-575
244. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J: Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 1994, 93: 2578-2583
245. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E: Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology* 2002, 143: 4828-4836
246. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr: Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998, 31: 451-458
247. Benetos A, Lacolley P, Safar ME: Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997, 17: 1152-1156
248. Ullian ME, Schelling JR, Linas SL: Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension* 1992, 20: 67-73
249. Ullian ME, Fine JJ: Mechanisms of enhanced angiotensin II-stimulated signal transduction in vascular smooth muscle by aldosterone. *Journal of Cellular Physiology* 1994, 161: 201-208
250. Losel RM, Feuring M, Falkenstein E, Wehling M: Nongenomic effects of aldosterone: cellular aspects and clinical implications. *Steroids* 2002, 67: 493-498
251. Greene EL, Kren S, Hostetter TH: Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *The Journal of Clinical Investigation* 1996, 98: 1063-1068
252. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL: Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 2002, 40: 504-510
253. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT: Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *The American Journal of Pathology* 2002, 161: 1773-1781
254. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, Dechend R, Mervaala E, Hampich F, Fiebeler A, Ju X, Finckenberg P, Theuer J, Viedt C, Kreuzer J, Heidecke H, Haller H, Zenke M, Luft FC: Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *The American Journal of Pathology* 2002, 161: 1679-1693
255. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M: Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 2005, 97: 434-442
256. McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ: Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 1993, 91: 2470-2478
257. Wittmann István, Wagner Zoltán, Pótó László, Wagner László, Mazák István, Nagy Judit: Karbonil stressz-metabolitok kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. *Orvosi Hetilap* 1999, 33: 1841-1845
258. Sell DR, Monnier VM: Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *The Journal of Biological Chemistry* 1989, 264: 21597-21602
259. Stitt AW: Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *British Journal of Ophthalmology* 2001, 85: 746-753

260. Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K: Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *Journal of the American Society of Nephrology* 1996, 7: 1198-1206
261. Wadman SK, De Bree PK, Van Sprang FJ, Kamerling JP, Haverkamp J, Vliegenthart JF: N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine, a constituent of human urine. *Clinical Chimica Acta* 1975, 59: 313-320
262. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR: The advanced glycation end product, Nεpsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 9982-9986
263. Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H: Advanced glycooxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association* 2004, 104:1287-1291
264. Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A: Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 10828-10832
265. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW: N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 1995, 34: 10872-10878
266. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG: Increased accumulation of the glycooxidation product N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *The Journal of Clinical Investigation* 1997, 99: 457-468
267. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K: Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999, 10: 822-832
268. Bendayan M. Immunocytochemical detection of advanced glycated end products in rat renal tissue as a function of age and diabetes. *Kidney International* 1998, 54: 438-447
269. Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED: Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1999, 42: 728-736
270. Schalkwijk CG, Baidoshvili A, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW, Niessen HW: Increased accumulation of the glycooxidation product Nεpsilon-(carboxymethyl)lysine in hearts of diabetic patients: generation and characterisation of a monoclonal anti-CML antibody. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1636, 82-89
271. Baidoshvili A, Niessen HW, Stooker W, Huybregts RA, Hack CE, Rauwerda JA, Meijer CJ, Eijssman L, van Hinsbergh VW, Schalkwijk CG: N(omega)-(carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels. *Atherosclerosis* 2004, 174: 287-292
272. Jono T, Kimura T, Takamatsu J, Nagai R, Miyazaki K, Yuzuriha T, Kitamura T, Horiuchi S: Accumulation of imidazolone, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathology International* 2002, 52: 563-571
273. Pertynska-Marczewska M, Kiriakidis S, Wait R, Beech J, Feldmann M, Paleolog EM: Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte/macrophages. *Cytokine* 2004, 28: 35-47
274. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppia M, Rayfield EJ: Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99, 15596-15601
275. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT: Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280: 12087-12095
276. Satoh H, Togo M, Hara M, Miyata T, Han K, Maekawa H, Ohno M, Hashimoto Y, Kurokawa K, Watanabe T: Advanced glycation endproducts stimulate mitogen-activated protein kinase and proliferation in rabbit vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, 239: 111-115
277. Wang R, Kudo M, Yokoyama M, Asano G: Roles of advanced glycation endproducts (AGE) and receptor for AGE on vascular smooth muscle cell growth. *Journal of Nippon Medical School* 2001, 68: 472-481
278. Mizutani K, Ikeda K, Yamori Y: Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, 274, 61-67

279. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, Dohi K, Makita Z, Vlassara H, Bucala R: Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *The American Journal of Pathology* 1993, 143: 1649-1656
280. Stitt AW, He C, Friedman S, Scher L, Rossi P, Ong L, Founds H, Li YM, Bucala R, Vlassara H: Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Molecular Medicine* 1997, 3: 617-627
281. Forbes JM, Yee LT, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Thomas MC, Burns WC, Deemer EK, Thorpe SM, Cooper ME, Allen TJ: Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes* 2004, 53: 1813-1823
282. Birn H, Vorum H, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI: Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology* 2000, 11: 191-202
283. Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Stahl RA: Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells. *Kidney International* 2004, 66: 1849-1858
284. Tang S, Leung JC, Abe K, Chan KW, Chan LY, Chan TM, Lai KN: Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, 111: 515-527
285. Takaya K, Koya D, Isono M, Sugimoto T, Sugaya T, Kashiwagi A, Haneda M: Involvement of ERK pathway in albumin-induced MCP-1 expression in mouse proximal tubular cells. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 2003, 284: F1037-1045
286. Wang SN, LaPage J, Hirschberg R: Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney International* 2000, 57: 1002-1014
287. Pedrini MT, Levey AS, Lau J, Chalmers TC, Wang PH: The effect of dietary protein restriction on the progression of diabetic and nondiabetic renal diseases: a meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* 1996, 124: 627-632
288. Ciavarella A, Di Mizio G, Stefani S, Borgnina LC, Vannini P: Reduced albuminuria after dietary protein restriction in insulin-dependent diabetic patients with clinical nephropathy. *Diabetes Care* 1987, 10: 407-413
289. Walker JD, Bending JJ, Dodds RA, Mattock MB, Murrells TJ, Keen H, Viberti GC: Restriction of dietary protein and progression of renal failure in diabetic nephropathy. *The Lancet* 1989, 2: 1411-1415
290. Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M: Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney International* 2003, 63: 464-476

## 10. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozok a **Mindenhatónak**, hogy **szüleim** szeretete, irányítása és **testvéreim** szeretete által segítettek és segítenek a mindennapokban. Köszönöm **nagyszüleimnek** a sok velük eltöltött időt és mindazt amit megtanultam tőlük. Mined nap nagyon sok örömet ad számomra a **feleségemmel, Inkével, Jánoskával és Csongorral** eltöltött idő. Köszönet illeti **feleségem szüleit** a segítségért, ami által lehetőségem volt többet foglalkoznom a dolgozattal

Nagyon sokat köszönhetek e munka létrejöttében **Wittmann István** professzor úrnak azért a segítségért, amit a kísérletek tervezése, kivitelezése és az eredmények értékelése, valamint végleges formába öntése terén nyújtott, sokszor nem kevés türelmet tanusítva, a tudományos élet mellett lévő emberre is kiterjedő figyelme mellett. Köszönet illeti **Nagy Judit** professzornőt, aki lehetőséget teremtett e munka létrejöttéhez, tanácsaival, részletes útmutásaival, gondolkodásmódjával az apró részletekre is kiterjedő figyelmével.

Sok hálával gondolok **Kocsis Béla** tanár úrra azért a türelemért, amivel a kuttások terén megtett első lépéseimet kísérte, irányította és önzetlen segítségért, amit a mai napig tapasztalok tőle.

Köszönöm a munka létrejöttében nélkülözhetetlen segítséget nyújtó **Wagner László, Wagner Zoltán, Molnár Gergő** útmutatását, segítségét.

A laborban végzett munkában sok segítséget kaptam **Dr. Sámikné Varga Icától és Heitmanné Lendvai Anikótól**.

Köszönet illeti a dolgozat eredményeinek létrejöttében, valamint a kutatás mellett végzett klinikai munkában tanúsított türelmükért **Szelestei Tamás** főorvos urat, **Belágyi László** professzor urat, **Póto László** tanár urat, **Kovács Tibor** tanár urat, **Degrell Péter** adjunktus urat, **Pintér István** tanársegéd urat, **Schmelszer Matild** tanárnőt, **Fábián György** adjunktus urat, **Szigetin Nóra** tanársegédnőt, **Késői István** tanársegéd urat, **Vas Tibor** tanársegéd urat, **Sebők Judit** tanársegédnőt, **Csiky Botond** főorvos urat, **Fazekas Attila** tanársegéd urat, **Kassai Gábor** tanársegéd urat.

**Udvarácz Ildikónak, Véber Tündének, Kiss Ibolyának, Bognár Péternek, Szabó Miklósné Emiliának, Rumsauer Zsuzsannának és Bodor Enikőnek** és klinika többi dolgozójának, nővéreinek, PhD-hallgatóinak és TDK-s hallgatóinak szintén köszönettel tartozom.

Köszönettel tartozok **Friedrich C Luft**nak, aki lehetővé tette, hogy az itthonitól eltérő körülmények között tanulhattam és gyűjthettem tapasztalatot, valamint igen eredményesen zárhattam munkámat. Ugy szintén köszönettel tartozok **Dominik Müllernek, Anette Fiebelernek, Ralf Dechendnek**, a sok segítségért, tanácsért melyet tőlük kaptam. Szintén segítettek dolgozatom létrejöttét **Susanne Wissler, Jürgen Janke, Carsten Lindschau, Gabriela N'diaye, May-Britt Köhler, Petra Quass és Matilde Schmidt**.

Köszönöm mindazok munkáját, akiket a fentiekben nem említettem meg, viszont hozzájárultak munkám létrejöttében.