

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

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Dr. Mazák István**

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum

Pécs, 2007

**Rövidítések jegyzéke:**

AGE	-	előrehaladott glikációs végtermékek
Ald	-	aldoszteron
AP-1	-	aktivátor fehérje 1
AT <sub>1</sub>	-	angiotenzin receptor 1
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	-	intracelluláris szabad ionizált kalcium
cGMP	-	ciklikus guanozin monofoszfát
CML	-	N <sup>ε</sup> -karboximetil-lizin
CRP	-	C reaktív fehérje
CV	-	kardiovaszkuláris
DCF-DA	-	dichlorofluorescein-diacetát
DCF	-	dichlorofluorescein
DMSO	-	dimetilsulfoxid
DP	-	dohányfüst puffer
EGF	-	epiteliális növekedési faktor
EGFR	-	epiteliális növekedési faktor receptor
EPHESUS	-	eplerenone post acute myocardial infarction efficacy and survival study
ER	-	endoplazmatikus retikulum
ERK 1/2	-	extracellulárisan szabályozott kináz ½
ESR	-	elektronspin rezonancia
Fe <sup>2+</sup>	-	ferro ion
Fe <sup>3+</sup>	-	ferri ion
Fura-2-AM	-	fura-2-acetoximetilészter
GSH	-	redukált glutation
OH <sup>•</sup>	-	hidroxil szabad gyök
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	hidrogén peroxid
IL	-	interleukin
IP-3	-	inozitol trifoszfát
JNK	-	cJUN anion terminális kináz
MAPK	-	mitogén aktivált protein kináz
MG	-	metilglioxál
MR	-	mineralokortikoid receptor
NADH	-	nikotinamid adenin dinkleotid
NADPH	-	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NF-κB	-	nukleáris faktor kappa B
NO	-	nitrogén monoxid
NOS	-	nitrogén monoxid szintáz
eNOS	-	konstitutív nitrogén monoxid szintáz
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	-	szuperoxid szabad gyök
OPA	-	orto-phthalaldehid
p38	-	p38 kináz
RAAS	-	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
RAGE	-	AGE receptor
RALES	-	randomized aldactone evaluation study
RAS	-	renin-angiotenzin rendszer
SD	-	Sprague Dewley
SEM	-	az átlag standard hibája
SH	-	szulfhidril csoport
SOD	-	szuperoxid dizmutáz
Spi	-	spironolacton
dTG-patkány	-	humán renin és humán angiotenzinogén génre kettős transzgenikus patkány
TNF-α	-	tumor nekrosis faktor alfa
vvt	-	vörösvértest

## 1. BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris (CV) betegségek, a 2-es típusú cukorbetegség és a vesebetegségek kialakulása számos exogén és endogén károsító patogenetiki tényezőre vezethető vissza. Ezen tényezők rövid összefoglalás olvasható az alábbiakban.

### 1.1. A szabad gyökök

A szabad gyök rendkívül reakcióképes vegyület (szuperoxid ( $O_2^{\bullet}$ ), a hidroxil szabad gyök ( $OH^{\bullet}$ ), a nitrogén-monoxid(NO)). Nem szabad gyök a hidrogén peroxid ( $H_2O_2$ ), a peroxinitrit, amelyek erélyes oxidálószer.

Szabad gyökök keletkeznek, pl. a  $H_2O_2$  bomlása során vas jelenlétében (Fenton reakció). A keletkezett  $O_2^{\bullet}$ , hidroxil szabad gyökké alakul át (Haber-Weiss reakció).

A szervezetben keletkező szabad gyökök – pl. a nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (NADPH) oxidáz enzimkomplex révén - számos fiziológiai folyamatban fontos szabályozó szereppel bírnak. Másodlagos hírvivő szerepük ismert, pl. a sejtnövekedésben, egyes gének expressziójában, a hormonszintézisben. A NADPH oxidáz által termelt  $O_2^{\bullet}$  fontos szereppel bír a MAPK (mitogén aktíviált protein kináz) rendszer szabályozásában. A szabad gyökök hatásának szabályozásában fontos szerep jut az antioxidáns rendszereknek (SOD, kataláz, glutation, glutation peroxidáz, glutation reduktáz).

### 1.2 A dohányzás hatása

A dohányzás során nagy mennyiségben keletkező szabad gyökök (pl. a dohányfüst által fokozott aktivitású NAD(P)H oxidáz által termelt) szerepe fontos a CV szövődmények kialakulásában. A dohányzás fokozza a trombociták aggregációs képességét, elősegíti a monociták adhézióját az endothel sejtekhez, fokozz migrációjukat a szövetekbe.

### 1.3 Az előrehaladott glikációs végtermékek hatása

Az in vitro is keletkező (pl. a táplálék elkészítésekor) előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) cukorbetegségben és végstádiumú vesebeteggekben felszaporodnak a szövetekben. Az AGE keletkezése során létrejövő Amadori termékekből igen reakcióképes 3-deoxiglukozon, metilglioxál (MG) és glioxál képződik, melyek felhalmozódását karbonil stresszként is ismerjük. A AGE-k RAGE-hoz (AGE receptor) kapcsolódva többek között szabadgyök-képződését indukálnak.

#### 1.4 A vas hatása

A vas átmeneti fémként nélkülözhetetlen több enzim működéséhez, az oxigén transzportjához. Káros folyamatokat is tud katalizálni. Cukorbetegségben, krónikus veseelégtelenségben a vas anyagcsere károsodása mellett, a vas felszaporodik a vasraktárakban és fokozottan szabadul fel onnan. Komplexeket alkotva szabadgyökös-reakciókat katalizál a glikációs végtermékek képződésének fokozása mellett.

#### 1.5. Az intracelluláris kalcium szerepe

Az intracelluláris kalcium szint növekedése a sejtek károsodásához, sejthalálhoz vezet. A  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedéséhez vezetnek a  $H_2O_2$ , a  $O_2^*$ , az angiotenzin II és a kalcium. A  $[Ca^{2+}]_i$  szintjének szabályozásában a sejtmembrán csatornák mellett fontos szereppel bírnak a sejtek kalciumot kötő, raktározó egységei (endoplazmatikus retikulum (ER), mitochondrium, Golgi szerv). A  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedése a konstitutív nitrogén monoxid-szintáz (cNOS) aktiválásához vezet, ami nitrogén monoxid (NO) termeléssel jár.

#### 1.6 A renin - angiotenzin – aldosteron rendszer

A renin - angiotenzin – aldosteron rendszer (RAAS) szerepe fontos a vérnyomás, a só-, folyadékháztartás szabályozásában. Az angiotenzin II hatásáért döntően az angiotenzin 1-es típusú receptora ( $AT_1$ ) tehető felelőssé. Serkenti a sejteket növekedését, befolyásolja a szövetek és az érfal felépítését. Az aldosteron (Ald)  $Na^+$ -retenciót okoz, fokozza a  $K^+$  ürítését, a szimpatikus aktivitást, fibrózist, érkárosodást indukál. Az Ald nem-genomikus hatását (cicloheximiddel és actinomycin-D-vel nem gátolható) számos sejten, szöveten sikerül megfigyelni. Megváltoztatja az intracelluláris pH-t, növeli az intracelluláris  $Na^+$ , és kalcium szintet, a sejttérfogatot, epiteliális növekedési faktor receptort (EGFR) és extracellulárisan szabályozott kináz 1/2-t (ERK1/2) aktivál transzkripciótól és translációtól függetlenül. Az Ald szerepe fontos CV patogenezisében, amit a Spi és az Epl eredményes morbiditást és mortalitást csökkentő hatásával sikerült igazolni.

#### 1.7 A MAP-kináz rendszer szerepe

A MAPK családkhoz tartozik az ERK1/2, a cJUN anion terminális kináz (JNK), a p38 kinázok különböző izoformáit, az extracellulárisan szabályozott kináz (ERK) 3 és 4, valamint az

extracellulárisan szabályozott kináz 5 (ERK5). Az ERK 1/2 aktiválódását eredményezik egyes citokinek az angiotenzin II, integrinek csoportosulása. Az ERK 1/2 aktiválja többek között az Elk-1, a c-Myc, a c-Jun és az AP-1 transzkripciós faktorokat, ami befolyásolja a sejtek proliferációját, differenciálódását, a sejtek túlélését. A JNK aktiválható citokinekkal, G-protein-kapcsolt receptorokkal és növekedési faktorokkal. A JNK-nak szerepe van az apoptózisban, a sejtek növekedésében, proliferációjában, a sejtek differenciálódásában, a sejtek stresszre adott válaszába, a sejtek túlélésében. A p38 kináz foszforilálódik pl. oxidatív stressz, citokinek (pl. IL-1, TNF- $\alpha$ ) és angiotenzin II hatására. A p38 kináz gátlásával sikerült megakadályozni a sejtek növekedését. Működése fontos a trombociták aggregációjában, immunológiai és gyulladásos folyamatokban, az adhézióban.

## 2. 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 (vvt) 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 Spi képes-e befolyásolni az angiotenzin II MAP kinázokra kifejtett hatását, valamint az angiotenzin II-indukálta szabadgyök-termelést.
- Vizsgáltuk humán reninre és humán angiotenzinogénre kettős transzgenikus patkányban az Epl hatását a vérnyomásra, a szívműködésre, 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.

### 3. MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK

#### 3.1. Az MG és vas hatása a szabadgyök-képződésre és az ionizált kalcium intracelluláris koncentrációjára izolált humán vvt-kben

Fluoreszcens módszerrel, dichlorofluoresceinnel (DCF) vizsgáltuk, hogy az MG képes-e szabadgyök-termelést indukálni vvt-kben. A vvt-kben mértük az intracelluláris, alacsony mólsúlyú SH-vegyületek szintjének alakulását. Az ionizált intracelluláris kalciumszint változását szintén spektrofluoriméterrel mértük vvt-kben MG és  $\text{Fe}^{2+}$  hatására, szabadgyök-fogó vegyületek valamint vaskomplexáló vegyületek nélkül és azok jelenlétében.

Égészséges önkéntesektől vett vérmintát DCF-fel és fura-2-vel inkubáltuk. A DCF a szabadgyök-képződés, a fura-2 pedig az intracelluláris ionizált kalciumszint érzékeny fluoreszcens jelzője. A mérés elején antioxidánsokat adtunk a vvt-szuszpenzióhoz (SOD, kataláz, trolox, deferroxamin, GSH).

Eredményeinket 6 független mérésből számolt, átlag  $\pm$  SD formájában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez a Student-féle kétmintás t-tesztet használtuk.

Mind a  $\text{Fe}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ), mind az MG (1 mM) hatására nőtt a szabad gyökök képződése, mely az oxidatív stresszt jelzi. Az ionizált kalcium intracelluláris koncentrációja a vvt-kben, mind  $\text{Fe}^{2+}$ , mind pedig MG hatására megemelkedett.

A  $\text{Fe}^{2+}$  MG-vel történő együttes inkubációja vvt szuszpenzióban nem fokozta a dichlorofluorescein fluoreszcenciáját a  $\text{Fe}^{2+}$ -höz viszonyítva. Az MG-kiváltotta  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedéshez viszonyítva a  $\text{Fe}^{2+}$ -vel történő együttes inkubáció kisebb  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szint-változást okozott, ami megegyezett a  $\text{Fe}^{2+}$  kiváltotta  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szint-változással.

Az MG az izolált vvt-kben koncentrációfüggően fokozta a szabadgyök-képződést és az ionizált kalcium intracelluláris koncentrációját. Az antioxidánsok és a desferrioxamin szignifikánsan csökkentette az MG által kiváltott szabadgyök-képződést és az intracelluláris kalcium akkumulációt.

Az intracelluláris alacsony mólsúlyú SH csoport méréséhez fluoreszcens módszert használtunk orto-phthalaldehiddel (OPA) történő derivatizálást követően. A minta fluoreszcenciáját 340 nm-es excitációs és 425 nm-es emissziós hullámhosszon mértük 10 mg/ml metanolos OPA-oldat hozzáadása előtt és után. Eredményeinket a kontroll százalékában, három független mérésből számolt átlag  $\pm$  SEM formájában adtuk meg. A statisztikai vizsgálathoz a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk.

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 és a 30 perc közötti inkubációs idők esetén volt szignifikáns ( $p < 0,05$ )).

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

A vas katalizáló hatásának vizsgálatához  $\text{Fe}^{3+}$ -t vagy  $\text{Fe}^{2+}$ -t adtunk az arginint és MG-t tartalmazó oldathoz. A vas specifikus hatásának bizonyításához desferrioxamint (10 mM) és ferrozint (40 mM) használtunk. Az ESR méréseket 8,5-ös pH-n végeztük a következő beállítások mellett: mikrohullámú teljesítmény: 20 mW, modulációs amplitúdó: 0,2 G, scan szélesség: 100 G.

Az arginin és az MG reakciója során az L-alanin vizsgálata kapcsán már leírt ESR-spektrum keletkezett. A  $\text{Fe}^{3+}$  növelte, a  $\text{Fe}^{2+}$  pedig csökkentette az ESR-jel intenzitását.

A  $\text{Fe}^{3+}$  koncentrációfüggő, szabadgyök-képződést fokozó és a  $\text{Fe}^{2+}$  koncentrációfüggő, szabadgyök-képződést gátló hatását igazoltuk. A  $\text{Fe}^{3+}$  szabadgyök-képződést fokozó hatása desferrioxaminnal, a  $\text{Fe}^{2+}$  szabadgyök-képződést gátló hatása ferrozinnal volt kivédhető, az MG-t és arginint tartalmazó rendszerben.

### 3.3. Az MG hatására bekövetkező vasredukció

A  $\text{Fe}^{3+}$  MG hatására bekövetkező redukcióját ferrozin felhasználásával, spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk.

A  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozin komplex abszorpciós maximuma 561 nm-nél detektálható. Vizsgálatunkban az abszorpciót 561 nm-nél Hitachi 2001 spektrofotométerrel mértük, desferrioxamin jelenlétében és desferrioxamin nélkül.

MG hatására vas redukció volt megfigyelhető, ami desferrioxaminnal gátolhatóan bizonyult. Az MG-t nem tartalmazó oldatban nem jött létre vas redukció.

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

A  $\text{Fe}^{3+}$  és a  $\text{Fe}^{2+}$  ion (10 mM) szabadgyök-képződést befolyásoló tulajdonságát az arginin + MG rendszerben vizsgáltuk a képződő termékek abszorpciós spektrumának összevetésével,

Hitachi 2001 spektrofotométerrel.

Az arginin és az MG reakciójából származó termék abszorpciós spektrumát a látható hullámhossztartományban (490 nm) mértük  $\text{Fe}^{2+}$  illetve  $\text{Fe}^{3+}$  jelenlétében.

Mind a  $\text{Fe}^{2+}$ , mind a  $\text{Fe}^{3+}$  esetében a 490 nm-nél található csúcs növekedését azonos abszorpciós spektrumú reakciótermék okozta. A  $\text{Fe}^{2+}$  hatására gyorsabban játszódik le a 490 nm-es hullámhossznál mért színreakció, mint a  $\text{Fe}^{3+}$  esetében.

### 3.5. A dohányfüst hatása a bradikinin-kiváltotta kalcium beáramlásra

Sertés aorta endothel sejteket - füstszűrős cigaretta (Camel) füstjét és Krebs oldaton buborékoltatva nyert - dohányfüst pufferral (DP) inkubáltuk és koncentráció (DP koncentráció 6,25%-50%) és időfüggést vizsgálatunk. A dohányfüst egyik összetevőjével, a formaldehiddel, 30 percet inkubáltuk a sejteket 1-80  $\mu\text{M}$ -os koncentrációval. A GSH (0,5-4 mM) hatásának vizsgálatához 25%-os DP-vel és 80  $\mu\text{M}$ -os formaldehiddel inkubáltuk a sejteket GSH-val történő inkubációt követően.

A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint méréséhez Fura-2-AM-et használtunk. A kalcium beáramlást küvetta helyezett, sejtekkel benőtt fedőlemezt használva mértük, 250 nM bradikinin hozzáadását követően. A mérést Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel végeztük, 37°C-on. Az emissziós hullámhossz 510 nm, az excitációs hullámhosszok 340 és 380 nm voltak. Öt egymástól független mérés értékét a kontroll százalékában fejeztük ki.

A sejtek GSH és thiol tartalmát OPA-val határoztuk meg fluoreszcens módszer segítségével. A 80  $\mu\text{M}$  formaldehiddel vagy 50% DP-vel kezelt sejtek feldolgozását követően mértük a fluoreszcenciát 340 nm excitációs és 425 nm emissziós hullámhosszon. Az OPA nélküli és OPA-val mért érték különbségét hasonlítottuk a GSH standard sorhoz (0,625-10  $\mu\text{M}$ ).

A sejtek protein-thiol tartalmát is meghatároztuk. A GSH standardhoz hasonlítottuk. A fehérje tartalmat Lowry szerint határoztuk meg, a perklorosavas homogenátum üledékéből. A GSH mérés eredményét  $\mu\text{mol/g}$  fehérjében, míg a protein-thiol tartalmat  $\mu\text{Equ GSH/g}$  fehérjében tüntettük fel.

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

A DP gátolta a bradikinin-kiváltotta kalcium beáramlást. A 6,25%-os és a 12,5%-os DP nem váltott ki érzéklehető változást, azonban a 25%-os és az 50%-os DP hatására a kalcium beáramlás jelentősen csökkent ( $p < 0,001$ ). 25%-os DP-vel időfüggő kalciumbeáramlás-



csökkenést mértünk, mely már 10 perc után szignifikáns volt ( $p < 0,001$ ). 4 mM GSH-val ( $p < 0,01$ ) teljes egészében, 2 mM GSH-val ( $p < 0,05$ ) részlegesen volt gátolható a 25%-os DP hatása a bradikinin-kiváltotta kalcium beáramlásra. A bradikinin-kiváltotta kalcium beáramlás formaldehid 10  $\mu\text{M}$ -os ( $p < 0,05$ ) vagy annál magasabb koncentrációjával koncentrációfüggő módon gátolhatónak bizonyult. GSH-val a 80  $\mu\text{M}$ -os formaldehid hatása kivédhető volt. 50%-os DP csökkentette a sejtek GSH és fehérje-thiol tartalmát. A formaldehidnek ilyen hatása nem volt.

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

Vizsgálatainkhoz Sprague-Dawley (SD) patkány aortából nyert simaizom sejteket használtunk. A sejteket eltérő ideig stimuláltuk Ald-dal ( $10^{-7}$  M). A Western blothoz az elsődleges antitesttel történt inkubációt követően (poliklonális anti-foszfo-ERK 1/2 illetve poliklonális anti-foszfo-JNK, 1:1000) másodlagos antitesttel inkubáltuk a membránokat (1:5000, kecskében termeltetett, torma-peroxidázzal konjugált, anti-patkány IgG ellenes). Az előhívást követően denzitometriával határoztuk meg az ERK 1/2-, és JNK-foszforilációt.

Az eredmények 4-6 egymástól független kísérlet átlagát összegzik. Az Ald időfüggően fokozta az ERK 1/2 és a JNK foszforiláltságát, melyek maximumát a 10. percben érte el.

Az Ald-kiváltotta ERK 1/2- és a JNK foszforiláció gátolható volt mind az antioxidáns GSH-val (2 mM) és Tironnal (10  $\mu\text{M}$ ), mind AG 1478-cal (EGFR gátló).

### **3.7. Az Ald fokozza az angiotenzin II-kiváltotta ERK 1/2 és JNK foszforilációt.**

Vizsgálatainkhoz az előző pontban leírt anyagokat és módszereket használtuk, kiegészítve MAPK vizsgáló kittel (MAPK assay kit; Cell signaling) valamint konfokális fluoreszcens mikroszkópiával. Az angiotenzin II-t  $10^{-7}$  M-os, az Ald-ot  $10^{-7}$  M koncentrációban használtuk. A MAP-kináz vizsgáló kittet az előírásnak megfelelően alkalmaztuk. Az így nyert mintákat Western blottal dolgoztuk fel. Az elsődleges antitest foszfo-Elk-1 antitest (1:1000) volt, a másodlagos antitest, pedig torma-peroxidázzal konjugált anti-nyúl antitest volt (1:2000). A konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálathoz a sejteket fedőlemezre tenyésztettük. Angiotenzin II- és Ald-stimulációt követően elsődleges, majd másodlagos antitesttel történő inkubálást követően ágyasztuk be a sejteket. A mérést az MRC Laser Sharp program hisztogram funkciója segítségével készítettük. Az értéket a megfelelő sejtes terület átlagos fluoreszcens intenzitásaként fejeztük ki.

Az angiotenzin II kiváltotta ERK 1/2- és JNK foszforiláció maximumát egyaránt a 2.

percben érte el. Az Ald indukálta ERK 1/2- és JNK foszforiláció a stimulációt követő 10. percben érte el csúcspontját. Az ERK 1/2 foszforilációja az angiotenzin II és az Ald együttes adását követő 2. percben, JNK esetében már az első percben elérte hatásmaximumát. Konfokális mikroszkópos vizsgálattal és MAPK vizsgáló kittel igazoltuk az Ald MAPK foszforilációt fokozó hatását angiotenzin II jelenlétében. A MAPK vizsgáló kittel az Erk 1/2 szubsztrátjának, az Elk-nek a foszforiláltsága volt detektálható. Az angiotenzin II és az Ald együttes alkalmazása esetén alkalmazott szabadgyök-fogó (GSH, Tiron) sikeresen megakadályozta a MAPK aktiválódást. A kombináció kiváltotta MAPK foszforiláció gátolható volt AG 1478-cal.

### **3.8. A mineralokortikoid receptor (MR) -gátlók csökkentik az angiotenzin II-indukálta ERK 1/2 foszforilációt és a dTG-patkányokban kialakuló szervkárosodást**

A simaizom sejteket angiotenzin II  $10^{-7}$  M-os koncentrációjával stimuláltuk, 30 perces spironolaktonnal (Spi,  $10^{-6}$  M) történt előinkubációt követően. Ezt követően a mintákat Western blothoz, MAPK-vizsgáló kittel végzett kísérletekhez és konfokális fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz használtuk.

A simaizom sejteken végzett szabadgyök-meghatározást fluoreszcens módszerrel, DCF-DA-val végeztük. Előinkubálásra Spi ( $10^{-6}$  M, 30 perc) vagy 10  $\mu$ M koncentrációjú dimetil-szulfoxidot (DMSO, 30 perc; a fluoreszcens indikátor oldószere, kontrollként) használtunk. A méréseket Zeiss fluoreszcens mikroszkóppal végeztük 488 nm excitációs és 513 nm emissziós hullámhosszon. A eredmények 5 mérés átlagát jelezték. A simaizomsejtek MR expresszióját TaqMan polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk.

Az in vivo kísérleteket 4 hetes, hím, dTG-patkányokban (n=28) és azonos korú, nem transzgenikus SD patkányokon (n=7) végeztük. A dTG-patkány csoport 14 tagja 3 héten keresztül kapott Epl-t (100 mg,  $\text{kg}^{-1}$ ,  $\text{nap}^{-1}$  dózisban). A szisztolés vérnyomás mérését farokra helyezhető érzékelő segítségével végeztük. A vizeletalbumin-meghatározás ELISA segítségével történt (24 órás gyűjtött vizeletből). Az ehokardiográfiás vizsgálat M-módú és pulzus hullám Doppler módszerrel történt. A Doppler vizsgálatot színes Dopplerrel végeztük. A transzducer 7 MHz-es volt. Három mérés átlagát összegeztük. Az állatokat 7 hetes korukban leöltük.

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz 6  $\mu\text{m}$  vékony szöveteket metszettünk. A metszeteket elsődleges monoklonális antitesttel (kollagén IV-es típusa vagy foszfo-ERK1/2 elleni antitesttel), majd másodlagos anti-egér IgG ellenes antitesttel kezeltük. Mikroszkóppal (Zeiss Axioplan-2) történt az értékelés a minták eredetének ismerete nélkül. Minden metszetből 15 területet

értékeltünk komputerizált sejtszámláló programmal (K 300 3.0, Zeiss).

A Spi az angiotenzin II adását követő 10. percben szignifikánsan csökkentette az ERK 1/2 foszforilációját. A Spi fenti hatását az angiotenzin hatásmaximumán (2 perc) nem tudtuk kimutatni, amely eredmény konfokális fluoreszcens vizsgálattal is megerősítést nyert. Élő sejtenyészeten a Spi az 5. perctől szignifikánsan csökkentette az angiotenzin II indukálta szabadgyök-képződést.

Az Epl-lel nem kezelt dTG-patkányok (n=14) szisztolés vérnyomása magasabb volt mind a kontroll SD patkányok (n=7), mind pedig az Epl-lel kezelt dTG-patkányok (n=14) szisztolés vérnyomásánál ( $p < 0,05$  minden esetben). A vizelet albuminürítése jelentősen emelkedett a dTG-patkányokban a kontroll SD patkányokéhoz képest ( $p=0,001$ ). A vizelet albuminürítést az Epl jelentősen csökkentette dTG-patkányok esetében ( $p < 0,001$ ). Az Epl-kezelés csökkentette a kollagén IV-es típusának mennyiségét dTG-patkányok veséjében és szívében. A dTG-patkányok vese artériájának médiájában fokozott ERK 1/2 foszforiláció volt kimutatható, az SD-patkányok artéria médiájához képest, amit az Epl kezelés csökkentett. Az Epl-lel kezelt dTG-patkányokban kisebb volt a szív hipertrófia mértéke ( $p < 0,05$ ) és javult a diasztolés diszfunkción is (rendezte az E/A arányt) szemben a nem kezelt patkányokkal.

### **3.9. A táplálkozás hatása a szérum és a vizelet glikációs végtermékek szintjére**

A hőkezelt ételek, szérum AGE szintre, vizelet albuminürítésre, kreatinin clearancre és vérnyomásra kifejtett hatását 24 egészséges önkéntesen vizsgáltuk, prospektív, randomizált, cross-over vizsgálatban. A vizsgálat 4 hétig tartott. Mértük az önkéntesek szérum CML szintjének 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 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 osztottuk. Az "A" csoport tagjai a második vizsgálati héten magas fehérjetartalmú, hőkezelt (sütött, főzött) ételeket fogyasztottak. A "B" csoport magas fehérjetartalmú, nyers ételeket kapott. A harmadik héten, az önkéntesek mindkét csoportban ismét az általuk megszokott módon táplálkozhattak a fehérjebevitel mérséklésének javaslatával. A negyedik vizsgálati héten a csoportok diétáját felcseréltük. Az "A" csoport kapott

nyers, a "B" csoport pedig hőkezelt, magas fehérjetartalmú ételeket. Az első és a harmadik héten az étrend fehérjetartalmát az önkéntesek által készített diétás naplók alapján számítottuk ki. A vizsgálat második és negyedik hetében az önkéntesek kizárólag a klinikánk dietetikusai által összeállított étrendet, a klinikánkon elkészített ételeket fogyasztották. A hőkezelt és a nyers diéta fehérjetartalmát 3 g/ttkg/nap-ra állítottuk be (ultrafiltrált tejsavó-fehérje koncentrátummal), ami a WHO által javasolt napi fehérjebevitelnek közel négyszerese. A hőkezelt és nyers diéta CML tartalmát részletes étrendi leírásainkból a Kieleti Egyetem Táplálkozástudományi Intézetének munkatársai számították ki korábbi, különböző élelmiszereken elvégzett méréseik alapján. A hőkezelt diéta megközelítőleg 60 mg/nap CML-t tartalmazott, míg a nyers diéta CML tartalma elhanyagolható volt.

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. Az abszolút CML koncentráció meghatározásához N<sup>ε</sup>-karboximetil-aminokapronsavat használtunk standardként. Az abszorpciót ELISA automatában (Multiskan Ascent, Labsystems) 405 nm-nél mértük (referencia: 603 nm-nél).

A két csoport azonos diétás időszakainak eredményeit összevontuk, az eredményeket átlag ± SEM formában adtuk meg. Az egyes diétatípusok hatásának összehasonlításához egymintás t-tesztet használtunk.

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 szérum CML szint növekedett CML-dús proteinterhelés hatására. A CML-szegény proteinterhelés hatásár a CML szint nem változott szignifikánsan. A vizelet CML ürítés a CML-dús proteinterhelés során szignifikánsan ( $p < 0,0001$ ) magasabb volt a CML-ben szegény diéta esetén mérthez képest. A vizelet albuminürítésben – bár növekedést találtunk CML-dús diéta hatására - nem találtunk szignifikáns eltérést CML-dús és CML-szegény proteinterhelés hatására.

## 4. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### 4.1 Az MG indukálta arginin-módosulást vas jelenlétében szabadgyökös folyamatok katalizálják

Fokozott szabadgyök-keletkezés és/vagy fokozott aldehid képződés következtében kialakult oxidatív stressz és/vagy karbonil-stressz hatására, patofiziológiai folyamatokat alakulnak ki. Az MG szérumszintje cukorbetegség véreben az egészségesekéhez képest szignifikánsan magasabb. MG szintáz, citokróm P450 IIEI által és részben nem enzimátikus úton keletkezik. Az MG argininnel reagálva imidazolont, és/vagy argipirimidint képez, így fehérjék amino csoportjaival reagálva károsítja azok funkcióját.

A vas elektron donor és akceptor tulajdonsága révén vesz részt, pl. szabad gyökök képzésében. A cukorbetegség szérumának vas-kötő kapacitása csökkent, szöveti raktáraikban a vas szintje magasabb, mint az egészséges egyéneknél. Vvt modellben a vas és az MG kalcium beáramlást váltott ki. Az arginin és az MG reakciója kapcsán detektált ESR-jel intenzitását a  $Fe^{3+}$  fokozta, és a  $Fe^{2+}$  csökkentette. A desferroxamin csökkentette a  $Fe^{3+}$  hatását. A fentiek alapján a MG-anion jöhet létre olyan módon, hogy a  $Fe^{3+}$  elektront vesz el az MG-től és így  $Fe^{2+}$ -vé alakul. Az MG-anion képes komplexálni a  $Fe^{2+}$ -t és e komplex reagálhat az argininnel. Az arginin azért is fontos, mert az NO termeléséért felelős NOS enzim szubsztrátja, így szerepe van a vaszkuláris rendszer működésének szabályozásában.

### 4.2. Az MG és a $Fe^{2+}$ hatása a vvt-k kalcium szintjére, oxidatív státuszára

Az MG által kiváltott szabadgyök koncentráció-növekedés kalciumszint-emelkedést okoz vvt-kben. Az MG e hatása hasonló a szabadgyök-képződést kiváltó  $Fe^{2+}$ -éhez. Az oxidatív stressz, az emelkedett intracelluláris kalcium szint, az MG magasabb szérumszintje, valamint a vas megnövekedett intracelluláris jelenléte jellegzetes eltérések cukorbetegségben. A fenti folyamatok a vvt-membrán rugalmasságának csökkenéséhez illetve elvesztéséhez vezetnek, ami a mikrocirkuláció károsodásával, szövődmények megjelenésével jár együtt. Mind a vas, mind az MG kiváltotta oxidatív stressz és kalcium-akkumuláció kivédhető volt, szabadgyök-fogókkal és desferrioxaminnal. Az MG által okozott kalcium-akkumulációt gátló desferrioxamin az extracelluláris vas szerepét veti fel a folyamatban, ami azért is valószínű, mert a desferrioxamin nagyon lassan jut be a sejtekbe. Vvt-kben a GSH hatékonyan kivédte az MG-kiváltotta károsodást. A GSH jótékony hatását két úton fejtheti ki. Hatékonyságában szabadgyök-fogó tulajdonság mellett szerepe van a glyoxaláz útvonalnak. Vizsgálataink azt is igazolták, hogy MG

csökkentette a vvt-k alacsony molekulásúlyú thiol tartalmát, ami oxidatív stresszre utal. A fentiek alapján az MG toxikus hatása transzmembrán úton elsősorban sejtfelszíni módosítások révén érvényesül.

#### **4.3. A dohányfüst és a formaldehid hatása az endothel sejtek bradikinin-kiváltotta kalciumszint változására**

A dohányfüst és a formaldehid koncentrációfüggően gátolja a bradikinin-kiváltotta kalcium-szint növekedést. A dohányzás eNOS-NO-cGMP útvonalra kifejtett hatása nem  $O_2^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$ , vagy lipid peroxidáció függő. A GSH és más thiol csoport tartalmú vegyület csökkentette a dohányfüst károsító hatását. A dohányzás kapcsán jelentkező oxidatív stressz hatására – thiol csoportok oxidációjával- a sejtmembrán depolarizációja révén, indirekt módon gátolható az agonisták indukálta kalcium beáramlás.

A GSH megakadályozta a formaldehid - a bradikinin kiváltotta intracelluláris kalcium-szint-növekedésre kifejtett gátló - hatásának kifejlődését. A dohányzás, a szöveti NO szint csökkenéséhez vezet, aminek létrejöttében szerepe lehet az intracelluláris kalcium-szint-változás zavarának, és szerepe van az oxidatív stressznek.

#### **4.4. Az Ald hatása az angiotenzin II-indukálta ERK 1/2- és JNK-foszforilációra simaizomsejtekben**

Mind az angiotenzin II mind az Ald időfüggően fokozta az ERK 1/2 és JNK foszforilációját simaizomsejtekben, ami szabadgyök-fogóval és EGFR-gátlóval kivédhető volt. Az EGFR fontos szerepet tölt be az angiotenzin II- és Ald-mediálta sejtszintű hatásban, az EGFR ugyanis felelős az angiotenzin II-indukálta elhúzódó szabadgyök-képződésért és az ERK 1/2 foszforilációért. A JNK foszforilációja szabadgyök-függő folyamat, amiben az EGFR nem vesz részt.

Az Ald simaizomsejtekben néhány percen belül képes indukálni az ERK 1/2-foszforilációt. Az Ald fokozza az EGF-kiváltotta ERK 1/2-foszforilációt és megnöveli az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szintet. Az angiotenzin II-kiváltotta ERK 1/2- és JNK-foszforiláció Ald-al fokozható volt. Mind az angiotenzin II, mind az Ald esetében gátolható volt a MAPK foszforilációja GSH-val és tironnal. Mind az angiotenzin II-, mind az Ald-kiváltotta ERK 1/2-foszforiláció EGFR-függő. Az előzőek ismeretében feltételezhető, hogy az Ald és az angiotenzin II hatásában közös a korai NADPH oxidáz-aktivációtól az EGFR-foszforilációig tartó folyamat. Egy ilyen kapcsolódási pont lehet a c-src kináz, mely kináz szerepet játszik az EGFR kaveolákból történő

kiszabadulásában. A folyamat során képződő szabad gyökök szerepének fontosságára utal, hogy szabadgyök-fogóval sikerül gátolni mind az ERK 1/2, mind a JNK foszforilációját.

Az angiotenzin II és az Ald jelenléte számos káros folyamat indukciója mellett kóros körülmények között hipertrófiát indukál, valamint fibrózishoz vezet. Kísérleteink arra mutattak rá, hogy amennyiben az angiotenzin II és az Ald nagyobb mennyiségben van jelen vagy/és hatásuk fokozott, együttesen képesek fokozni a káros folyamatokat a renin-angiotenzin-aldoszteron klasszikus útvonaltól függetlenül is.

#### **4.5. A MR-gátlók hatása az angiotenzin II-indukálta ERK 1/2 foszforilációra simaizom sejtekben és a dTG-patkányokban.**

dTG-patkányokban végzett kísérleteinkben MR-gátló Epl csökkentette az albuminuriát, a szisztolés vérnyomást, a diasztolés diszfunkciót, a szív hipertrófia mértékét, valamint a kollagén-IV-es típusának mennyiségét a szívizomzatban. Az Epl csökkentette az ERK 1/2-foszforiláció mértékét a dTG-patkányok ereiben. Ismert az emelkedett szérum Ald szint és a szív fibrózisa közötti kapcsolat. Az MR tehető felelőssé mind a szívizom sejtekben talált  $\text{Na}^+$ -felvételért, mind a fibrózisért. A Spi a vérnyomástól függetlenül csökkenti a szív hipertrófiáját és fibrózisát, ami arra engednek következtetni, hogy az Ald a RAAS többi elemétől függetlenül is képes fibrózist indukálni a szívben.

Simaizom sejteket Ald-dal inkubálva megnőtt az angiotenzin-receptor expressziója, ez által az angiotenzin II-kiváltotta diacilglicerol-képződés és az intracelluláris kalciumszint-növekedés. Az általunk használt Epl kivédte az Ald fibrózist okozó hatását. Eredményeink az Ang és az MR közötti interakcióra engednek következtetni. Az  $\text{AT}_1$ -receptor egy első, korai és egy második, elnyújtottabb szakaszban szabadgyök-termelést vált ki a NADPH-oxidáz aktiválásával. Az Ald nem befolyásolja az Ang indukálta korai szabadgyök-képződést, amit állatkísérletes modellben is igazoltak. Ald-dal infundált patkányokban emelkedett a vérnyomás, és a patkányokból izolált mesenterialis artéria média/lumen hányadosa, valamint fokozott NADPH-aktivitást és NF- $\kappa$ B-aktivációt találtak. dTG-patkányokban a NADPH-oxidáz aktivitása jelentősen fokozott és NF- $\kappa$ B és AP-1 hatása szintén nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva.

Simaizom sejteket Spi-vel előinkubálva gátoltuk az angiotenzin II-kiváltotta ERK 1/2-foszforilációt, valamint az elhúzódó NAD(P)H-oxidáz enzim-aktivitást. A fenti eredmény alapján az angiotenzin II hatását már nagyon korán gátolhatjuk MR-blokkolóval, már az EGFR

aktiválódása előtt. A fenti eredmények alapján a megfelelő érvédelem eléréséhez nem elégséges az AT<sub>1</sub>-receptor hatásának kivédése, szükséges az Ald hatásának gátlása is.

#### **4.6. A hőkezelt, magas fehérjetartalmú ételek szérumszintre és az albuminuriára kifejtett hatásának vizsgálata egészséges önkénteseken.**

Az arginin glikációja magas hőmérsékleten pirazil, vagy pirimidinil képződésével jár. A magas hőmérsékleten keletkező szabad gyökök az ételek sütése, főzése során lezajló reakciókban játszanak szerepet. Így a táplálékkal fokozott mennyiségben juthatnak a szervezetbe oxidációs és glikációs végtermékek. Az *in vitro* előállított AGE-termékek fogyasztását követően szérumszint emelkedés, fokozott vizelet AGE-ürítés és a szövetekben fokozott AGE-lerakódás figyelhető meg egészséges egyéneknél. Vizsgálatunkban a magas protein tartalmú, hőkezelt (CML-dús) diéta hatására szignifikánsan nőtt az éhgyomri szérumszint és a vizelettel ürített CML mennyisége is. A hőkezelés nélkül elkészített ételek (CML-szegény diéta), annak ellenére, hogy fehérjetartalmuk magas volt, a vizelet CML-ürítés csökkenésével járt. Napjainkban 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 hagyományos sütéssel elkészített ételek CML tartalma legmagasabb a zsírban gazdag és legalacsonyabb a szénhidrátban gazdag ételek esetében. Számos szövetben sikerült igazolni az AGE termékek jelenlétét és felhalmozódását a CML kimutatásával. A CML- és általában az AGE-termékek jelenlétének és akkumulációjának jelentős patofiziológiai szerepe a RAGE-hoz kötődve jelentkezik, számos folyamatot indukálva. Felelőssé tehetőek a diabetesben tapasztalható érkárosodás kialakulásáért, szabályozott sejthalált képesek indukálni, MAP-kinázok foszforilációját indukálva fokozzák az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktivitását. Az AGE jelenléte igazolást nyert atheroscleroticus plakkokban, aminek fontosságát jelzi, hogy képződésüket gátolva az atheroscleroticus plakk mérete jelentősen csökkenthető volt.

A kreatinin clearance nem változott az AGE-termékekben gazdag táplálék hatására, azonban megnövelte a vizelet albuminürítést. 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. Különösen kedvezőtlen lehet a táplálékkal bevitt AGE-k hatása a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben, akiknél az AGE-termékek vesén keresztül



történő eliminációja elégtelen. 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. A fentiek alapján krónikus veseelégtelenségben szenvedő, illetve a romló vesefunkciójú cukorbetegség esetében fontos lehet az AGE-szegény diéta alkalmazása.

## 5. 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 GSH-val kivédhető volt. A dohányfüst csökkentette a sejtek GSH- és fehérje-thiol-tartalmát. A formaldehidnél nem volt megfigyelhető ilyen hatás.
- III. Az Ald nem-transzkripciós mehanizmussal, időfüggően aktiválja a simaizomsejtek ERK1/2 és JNK kinázait. Az Ald-kiváltotta ERK1/2- és JNK-aktiválás szabadgyök-függő.
- IV. Az angiotenzin II-kiváltotta MAP-kináz-foszforiláció Ald-dal fokozható. Az Ald által fokozott angiotenzin II-indukálta MAPK-foszforiláció szabadgyök-függő.
- V. Az angiotenzin II-indukálta MAPK-foszforiláció Ald hatására történő fokozódása a nukleáris transzkripciós faktorok (NF- $\kappa$ B, AP-1) szintjén is kimutatható.
- VI. A Spi csökkenti az angiotenzin II-indukálta ERK 1/2 foszforilációt. A Spi csökkenti az angiotenzin II-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 dTG-patkányokban. Az Epl csökkenti a szöveti ERK 1/2 foszforiláltsági szintjét dTG-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.

## 6. A szerző tézisekkel kapcsolatos publikációinak jegyzéke:

### Közlemények:

1. 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. (IF: 1,706)
2. **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. (IF: 1,512)
3. **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. (IF: 12,563)
4. **Mazák István**, Wittmann István, Wagner Zoltán, Wagner László, Nagy Judit: A dohányfüst gátolja a bradikinin kiváltotta kalcium-beáramlást az endothel sejtekben. Hypertonia és Nephrologia 2000; 4: 37-41.

### Kongresszusi absztraktok:

5. **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.
6. **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
7. **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

8. **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.
9. **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.
10. 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.
11. 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.
12. **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.
13. 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
14. **Mazák István**, Wittmann István, Wagner Zoltán, Pótó László, Faist Veronika, Schinzel Reinhard, Heidland August, Nagy Judit. Hőkezelt ételek fogyasztásának hatása a glikációs végtermékek szérumszintjére és vizeletürítésére, valamint az albuminuriára. *Magyar Belorvosi Archivum* (Suppl.2): 78, 2001

## 7. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozok a **Mindenhatónak**, hogy **szüleim** szeretete, irányítása és **testvéreim** szeretete által segített és segít a mindennapokban. Köszönöm **nagyszüleimnek** a sok velük eltöltött időt és mindazt, amit megtanultam tőlük. Minden nap nagyon sok örömet ad számomra a **feleséggel**, **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 tanúsítva, a tudományos élet mellett lévő emberre is kiterjedő figyelme mellett. Köszönet illeti **Nagy Judit** professzornőt, aki lehetőséget teremtett e munka létrejöttéhez, tanácsaival, részletes útmutatásaival, gondolkodásmódjával az apró részletekre is kiterjedő figyelmével.

Sok hálával gondolok **Kocsis Béla** tanár úrra azért a türelemért, amivel a kutatások 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, **Pótv László** tanár urat, **Kovács Tibor** tanár urat, **Degrell Péter** adjunktus urat, **Pintér István** tanársegéd urat, **Schmelszer Matild** tanárnőt, **Fábián György** adjunktus urat, **Szigeti Nóra** tanársegédnőt, **Késői István** tanársegéd urat, **Vas Tibor** tanársegéd urat, **Sebők Judit** tanársegédnőt.

**Udvarácz Ildikónak**, **Véber Tündének**, **Kiss Ibolyának**, **Szabó Miklósné Emiliának** 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. Úgyszintén 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.