

**A NITROGÉN MONOXID LEHETSÉGES  
SZEREPE AZ INZULIN HATÁSÁNAK  
KIFEJLŐDÉSÉBEN**

Adatok a diabeteses nephropathia pathogeneziséhez  
(PhD értekezés)

Dr. Wittmann István

II. sz. Belgyógyászati Klinika

POTE

1998

Programvezető: Prof. Dr. Nagy Judit

PHD ÉRTÉKELÉS

Dr. WITTMANN ISTVÁN

8104

1998

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretném megköszönni feleségem és szüleim önfeláldozó türelmét, ami nélkül ez a munka soha sem jött volna létre.

Hálásan köszönöm dr. Nagy Judit professzornő tanácsait, támogatását, irányítását, amik döntően befolyásolták tudományos gondolkodásomat és munkámat.

Köszönetet mondok tanárainknak, munkatársainknak:

Dr. Puppi Andrásnak

Prof. dr. Jávor Tibornak

Dr. Horváth Tündének

Dr. Past Tibornak

Prof. dr. Arthur I. Cederbaumnak

Prof. dr. Mózsik Gyulának

Prof. dr. Belágyi Józsefnek

Dr. Pótó Lászlónak

Dr. Kőszegi Tamásnak

Dr. Wagner Lászlónak

Kátai Józsefnek

Wagner Zoltánnak

Kovács Brigittának

Buzásné Varga Ilonának

és mindazoknak, akik eddigi munkám során támogatásukkal tiszteltek meg.

## TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. ÖSSZEFOGLALÁS	8
3. BEVEZETÉS	9
3.1. <i>Inzulin rezisztencia és ischaemiás szívbetegség</i>	9
3.2. <i>Inzulin rezisztencia és vesebetegség</i>	10
3.3. <i>Az inzulin rezisztencia pathomechanizmusának vizsgálata</i>	11
3.4. <i>A szabad gyökök jellemzői</i>	12
3.4.1. <i>A vízoldékony szabad gyökök</i>	13
3.4.2. <i>A lipid kompartment szabad gyökei</i>	14
3.4.3. <i>A víz- és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök (NO)</i>	14
3.4.4. <i>Nem-szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben</i>	16
3.4.5. <i>A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban</i>	18
3.4.6. <i>Szabad gyök képződés diabetes mellitusban</i>	17
3.4.7. <i>Antioxidánsok</i>	19
4. MUNKAHYPOTHESIS	23
5. MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK	24

5.1.	<i>Az inzulín másodlagos hírvivője az NO</i>	24
5.1.1.	<i>Izolált béka szív modell</i>	24
5.1.1.1.	<i>Módszer</i>	24
5.1.1.2.	<i>Eredmények</i>	25
5.1.1.3.	<i>Összefoglalás</i>	25
5.1.2.	<i>Thrombocyta ATP secretios modell</i>	26
5.1.2.1.	<i>Módszer</i>	26
5.1.2.2.	<i>Eredmények</i>	27
5.1.2.3.	<i>Összefoglalás</i>	28
5.1.3.	<i>Kemilumineszcenciás eljárás</i>	29
5.1.3.1.	<i>Módszer</i>	29
5.1.3.2.	<i>Eredmények</i>	30
5.1.3.3.	<i>Összefoglalás</i>	31
5.2.	<i>Az NO-jel inaktiválása</i>	32
5.2.1.	<i>cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben</i>	32
5.2.1.1.	<i>Módszer</i>	32
5.2.1.2.	<i>Eredmények</i>	33
5.2.1.3.	<i>Összefoglalás</i>	34
5.2.2.	<i>A dohányfüst fehérje degenerációt okozó hatásának mérése natív PAGE módszerrel</i>	35
5.2.2.1.	<i>Módszer</i>	35
5.2.2.2.	<i>Eredmények</i>	36
5.2.2.3.	<i>Összefoglalás</i>	37

5.2.3. Hypoxia modell	38
5.2.3.1. Módszer	38
5.2.3.2. Eredmények	39
5.2.3.3. Összefoglalás	40
5.2.4. Nem-enzimatikus glikációs modell	41
5.2.4.1. Arginin-glukóz reakció magas hőfokon	41
5.2.4.1.1. Módszer	41
5.2.4.1.2. Eredmények	42
5.2.4.1.3. Összefoglalás	42
5.2.4.2. Glukóz- és arginin-kiváltotta ferri-redukció	43
5.2.4.2.1. Módszer	43
5.2.4.2.2. Eredmények	43
5.2.4.2.3. Összefoglalás	43
5.2.4.3. Az arginin elektron donor képességének spin trap bizonyítéka	44
5.2.4.3.1. Módszer	44
5.2.4.3.2. Eredmények	44
5.2.4.3.3. Összefoglalás	44
5.2.4.4. Az arginin guanidino csoportjának jelentősége	45
5.2.4.4.1. Módszer	45
5.2.4.4.2. Eredmények	45
5.2.4.4.3. Összefoglalás	46
5.2.4.5. A glukóz szabad gyök képződése	47
5.2.4.5.1. Módszer	47
5.2.4.5.2. Eredmények	47

5.2.4.5.3.	Összefoglalás	47
6.	<b>MEGBESZÉLÉS</b>	48
6.1.	<i>Az inzulin-NO hatása az ionmozgásokra</i>	48
6.2.	<i>Az inzulin-NO hatása thrombocyta ATP secretiojára</i>	50
6.3.	<i>Az inzulin hatása a thrombocyta eNOS izoenzimre</i>	51
6.4.	<i>A dohányfüst gátló hatása a NOS-GC-cGMP rendszerre</i>	54
6.5.	<i>Szabad gyök termelés a pseudohypoxia modellben</i>	58
6.6.	<i>A nem-enzimatikus glikáció</i>	59
6.7.	<i>Szabad gyökök és gyökfogók (új terápiás eljárások)</i>	64
7.	<b>ÚJ EREDMÉNYEK</b>	68
8.	<b>A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</b>	72
9.	<b>IRODALOM</b>	78

## 1. RÖVÍDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP = adenzin trifoszfát

AUC = görbe alatti terület

BHT = dibutil hidroxi toluol

cGMP = ciklikus guanozin monofoszfát

DMPO = dimetil-1-pirrolin *N*-oxid

EDTA = etilén diamin tetraecetsav

ESR = elektron spin rezonancia

Fe<sup>2+</sup> = ferri vas

Fe<sup>3+</sup> = ferro vas

G6Páz = glukóz-6-foszfataz

GSH = glutation (redukált forma)

GSSG = glutation (oxidált forma)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = hidrogén peroxid

IDDM = inzulin dependens diabetes mellitus

IGF-1 = insulin like growth factor 1 (inzulinszerű növekedési faktor-1)

L-NA = N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin

L-NAME = N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil észter

MS = az epinephrin-kontroll maximális ATP szekréciójának százaléka

NADH = nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált forma)

NIDDM = nem-inzulin dependens diabetes mellitus

NO = nitrogén monoxid

NOS = nitrogén monoxid szintáz



cNOS = konstitutív NOS (az eNOS és az nNOS)

eNOS = NOS III. típus (endotheliális)

iNOS = NOS II. típus (indukálható)

nNOS = NOS I. típus (neuronális)

$O_2^{\cdot -}$  = szuperoxid szabad gyök

$\cdot OH$  = hidroxil szabad gyök

PAGE = poliakrilamid gél elektroforézis

PBN = *N-t*-butil-fenilnitron

PBS = foszfáttal pufferelt fiziológiás NaCl oldat

PPP = trombocyta-szegény plazma

PRP = trombocyta-dús plazma

SOD = szuperoxid dizmutáz

## 2. ÖSSZEFOGLALÁS

- A legfőbb halálokok közé tartozó arteriosclerosis legényesebb rizikófaktora a dohányzás és az inzulin rezisztencia syndroma, azaz a szénhidrát-, a zsíryanycsere zavarok, a hypertonia, az obesitas és a hyperuricaemia tünetegyüttese. A dohányzás inzulin rezisztenciára emlékeztető tüneteket is kiválthat.
- Eredményeink arra utalnak, hogy az inzulin subcelluláris jelátvitelc a nitrogén monoxid rendszeren keresztül valósul meg, melynek hatékonyságát idő és koncentráció függően csökkentti a dohányfüst.
- Igazoltuk, hogy a pseudohipoxia hatására superoxid szabad gyök is termelődik, mely kapcsolódva a nitrogén monoxidhoz, peroxinitritet képez. Ez a folyamat megakadályozza a nitrogén monoxid jelátvitelt és egyidejűleg oxidatív stresszhez vezet.
- Vizsgálataink szerint az arginin glikálható, és ez a reakció szabadgyökös jellegű. Az arginin glikáció hatására bekövetkező módosulása pedig károsíthatja a nitrogén monoxid szintáz működését, mivel az arginin ezen enzim szubsztrájtja, és így az arginin módosulatok a nitrogén monoxid szintáz enzim kompetitív antagonistái lehetnek.
- Véleményünk szerint az inzulin hatásának a nitrogén monoxid rendszeren keresztül történő manifesztálódása és a nitrogén monoxid jelátvitel sokoldalú modulálódása (dohányzással, hypoxiával, arginin glikációval) legalábbis részben, magyarázhatja az inzulin rezisztencia kialakulását.

### 3. BEVEZETÉS

#### 3.1. *Inzulin rezisztencia és ischaemiás szívbetegség*

A nyugati típusú életmódot folytató népesség körében 25-35 %-ra tehető az inzulin rezisztencia syndromában szenvedők aránya (1, 2, 3). A magyar populáció, ilyen szempontból, a nyugati típusú életvitelt folytató társadalmak közé tartozik. Sőt feltételezhető, hogy hazánkban ezen un. coca-kolonizációs betegség (4) súlyosabb formában fordul elő a mozgáskultúra hiánya és a nyugati típusú életforma mellett, kifejezetten hátrányos diétás hagyományok miatt

Mit jelent az, hogy inzulin rezisztencia syndroma? Az eredeti, Reaven által leírt tünetegyüttes mára sok tényezővel kiegészült, és különböző megjelöléseivel találkozhatunk: „Reaven syndroma”, „metabolikus X” vagy „multimetabolikus syndroma”, „small baby syndrome”, „halálos ötös syndroma”, „újvilág syndroma” stb (5, 6, 7, 8). A syndroma obligát összetevői az inzulin rezisztencia, a szénhidrát anyagcsere zavara, a férfias típusú (abdominális, vagy méginkább viscerális) obesitas, az essentialis hypertonia, a dyslipidaemia (általában hypertrigliceridaemia, gyakran hypercholesterinaemia és HDL cholesterolin csökkenés), és a hyperuricaemia. Ez a tünetegyüttes azért viseli a halálos jelzőt, mert symptómái a leglényegesebb cardio-vascularis rizikótényezőknek bizonyultak. Közismert tény, hogy a magyar populáció kritikusan magas halálozási mutatóiért elsősorban a cardio-vascularis megbetegedések felelősek. Ezen betegségek újonnan felismert rizikófaktoraikat mutatták ki az inzulin rezisztencia syndroma részét képező NIDDM-ben is (1. táblázat, (9) alapján módosítva).

### Újnan felfedezett koronáriszívbetegség rizikófaktorok NIDDM-ben

Rizikó faktorok	Feltételezett mechanizmus
Hyperglycaemia	Glikáció
Inzulin rezisztencia	?
Hyperinzulinaemia	Mátrix túlprodukción
Abdominális típusú obesitas	Dyslipidaemia
Emelkedett PAI-1	Csökkent fibrinolysis
Fokozott TCT aggregáció	Thrombosis
Emelkedett fibrinogén	Thrombosis
Oxidatív stress	Endothel dysfunctio
Vesekárosodás	Csökkent detoxikáció
Vegetatív neuropathia	Hirtelen halál

#### 3.2. *Inzulin rezisztencia és vesebetegség*

Tovább emeli az inzulin rezisztencia syndroma jelentőségét az a tény, hogy a syndroma tünetei a legfontosabb rizikófaktorai a diabeteses nephropathia kialakulásának, ami a végállapotú veseelégtelenség egyik leggyakoribb oka (10). Azt is megkockáztathatjuk, hogy az eddig diabeteses nephropathianak nevezett betegségre inkább az inzulin rezisztencia-nephropathia név illik. Alátámasztja ezt a véleményt a diabeteses nephropathiasnak gondolt betegek esetében elvégzett szövettani vizsgálatok eredménye is. A vesebiopsziák jelentős részében ugyanis nem találtak meg a korábban Kimmelstiel-Wilson syndromának nevezett típusos elváltozásokat, pedig NIDDM-ben szenvedtek mindannyian, ami az inzulin rezisztencia részünete (11,12).

A korábban kialakult felosztás, amely szerint diabetesben micro- és macroangiopathiás szövődményekről beszélhetünk, önkényes. A microangiopathia részének tartott diabeteses nephropathia macroangiopathiás tünetekkel társulhat (pl. inzulin rezisztenciában szenvedőknél a microalbuminuria inkább korrelál a myocardialis infarctus kockázatával mint a diabeteses nephropathia kialakulásával (13, 14). A macrovasculáris szövődmények mondott ischaemias szívbetegség gyakran jelentkezik az inzulin rezisztencia syndromában szenvedőknél anélkül, hogy coronarographiával nagyrészövődményt lehetne kimutatni (15) (az inzulin rezisztenciában jelentkező kísér-elváltozásokból eredő ischaemias szívbetegséget cardiologiai X syndromának nevezik).

### 3.3. Az inzulin rezisztencia pathomechanizmusának vizsgálata

Az említett új megfigyelések alapján valószínű, hogy a micro- és macroangiopathiás szövődmények eredete, pathomechanizmusa hasonló. Természetesen ez nem jelenti azt, hogy az egyes szervek haemodinamikai, anatómiai különbségei ne járhatnának szervspecifikus eltérésekkel, azonban a mélyben, sejt-, vagy méginkább subcelluláris szinten a folyamatok nagyon hasonlóak. A szervspecifikus elváltozások befolyásolása, éppen anatómiai stb jellegzetességeik miatt nehéz. Ezzel szemben az általános pathophysiologiai elváltozások befolyásolásával minden szerv védelmét elérhetjük. Típusos példa erre a Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) tanulsága, mely szerint a szénhidrát anyagcsere rendezése minden vizsgált szervi komplikációt kedvezően befolyásolt. Ugyanezen tanulmány, IDDM-ben szenvedő betegek esetében azonban arra is rámutatott, hogy a vércukor közel normál szintre csökkentése nem védte ki minden esetben a szövődmények, így pl. a diabeteses nephropathia kialakulását (16). Ezért tehát a cukorbetegségben szenvedőknél nem elég a szénhidrát anyagcsere rendezése. Fokozottan igaz ez az NIDDM-ben szenvedő betegekre, akiknél a cukor anyagcsere zavara mellett fennálló eltérések lényegesen többérték, és a

kérdés fontosságát aláhúzza az a tény is, hogy ezen betegek közül kerül ki az inzulin rezisztenciában szenvedők jelentős része.

NIDDM-es betegeknél újabban leírták, hogy a myocardialis infarctus kialakulásának a cukor anyagcsere zavarán kívül egyéb rizikófaktorai is vannak, pl. az inzulin rezisztencia, a hyperinzulinaemia, a nem-enzimatis glikáció, az oxidatív stress, amelyek a komplikációk pathomechanizmusát is megmagyarázhatják (9).

Az a régi adat, amely szerint a dohányzás a myocardialis infarctus rizikófaktor, új megvilágításba került az által az új megfigyelés által, hogy a dohányzás acut inzulin rezisztencia-szerű képet okoz (17).

Ezért a mi érdeklődésünk homlokterébe is az említett rizikófaktorok kerültek (az inzulin rezisztencia, a hyperinzulinaemia, a nem-enzimatis glikáció, az oxidatív stress és a dohányzás). Úgy gondoljuk, hogy ezeket a rizikófaktorokat egységesen a szabadgyökös pathomechanizmus köti össze.

#### 3.4. *A szabad gyökök jellemzői*

A szabad gyökök (reaktív oxigén specieszek, ROS) párosítatlan spinű elektronnal rendelkeznek, és ezért rendkívül reakcióképesek. Az egyed várható élettartama és a sejtjeiben kimutatható szabad gyök elfogó kapacitás (SOD (18), alfa tokoferol (19)) között egyenes arányosság áll fenn, ha az egyes emlős fajokat hasonlítjuk össze. Ez a tény is mutatja a szabad gyökök jelentőségét. A biológiai kompartmentek szemponyjából a szabad gyököknek két fő típusa van, az ún. vízdékony és a zsírkompartmentben megjelenő szabad gyökök. Vannak olyan gyökök is, amelyek mindkét térben előfordulhatnak.

### 3.4.1. A vízőldékony szabad gyökök

A biológiai rendszerekben is előforduló vízőldékony szabad gyökök közé tartozik a szuperoxid (hidroperoxi), a hidroxil, az alkil, és a tiil szabad gyök. Az alkil gyök a zsírfázisban is megtalálható (20):

*A szuperoxid szabad gyök* ( $O_2^{\cdot-}$ ) protonálódva hidroperoxi gyökké ( $HO_2^{\cdot}$ ) alakul át

(21). A szuperoxid szabad gyök kevésbé agresszív, mint pl. a hidroxil szabad gyök. A molekuláris oxigén egy elektronos redukciója során képződik (22). Mérsékelt reakciókészsége miatt viszonylag nagy távolságokat képes megtenni elbomlás nélkül, pl. a membránok anion csatornáin is képes áthatolni (23).

*A hidroxil szabad gyök* ( $\cdot OH$ ) a Haber-Weiss /1/ vagy a Fenton /2/ reakció révén képződhet (24).



A szervezetben alapállapotban csak a stabilabb ferri vas fordul elő, a ferri vas redukcióját ferro vassá pl. a szuperoxid szabad gyök válthatja ki az alábbiak szerint (25):



A Haber-Weiss reakciót, ugyanúgy mint a Fenton reakciót vas vagy réz katalizálja (26). A hidroxil szabad gyök az egyik legreakcióképesebb szabad gyök, ezért a sejtek vizes fázisában csak nagyon kis távolságot (1-3 angström) tud megtenni elbomlás nélkül, szinte diffúzió kontrollált reakcióban elreagál a biomolekulákkal (27).

*Alkil szabad gyök* ( $R^1R^2R^3C\cdot$ ) keletkezhet a szénhidrátok  $\cdot OH$  hatására létrejövő károsodása esetén a vizes fázisban és a később tárgyalandók szerint a lipid peroxidáció részeként is (28).

A *tiil szabad gyök* ( $R\cdot S\cdot$ ) a tiol tartalmú aminosavból (cisztein és származéka a glutation) képződik, hidroxil szabad gyök (29), vagy a később tárgyalandó peroxinitrit ( $OOONO\cdot$ ) hatására (30).

#### 3.4.2. Lipid-oldékony szabad gyökök (31)

A zsírfázisban keletkező szabad gyökök általában a lipid peroxidációnak nevezett folyamat eredményeképpen jönnek létre. Az így keletkező szabad gyökök az *alkil* ( $R^1R^2R^3C\cdot$ ), az *alkoxil* ( $R^1R^2R^3CO\cdot$ ), a *phenoxil* ( $PhO\cdot$ ) és a *peroxil szabad gyök* ( $R^1R^2R^3COO\cdot$ ). Ez utóbbi a jellemző a lipidek szabad gyökös károsodására, amit ezért lipid peroxidációnak is nevezünk. A lipid peroxidáció kialakulásához egy indító tényezőre van szükség, mely általában a vas redukált, ferro formája. Ezt a lépést iniciációnak hívjuk. A zsírsav peroxidációs folyamata a lipid fázisban, a mindig jelenlévő oxigénnel tovább terjed (propagáció), mindaddig, amíg a keletkezett gyökök egymással nem reagálnak, és így a folyamat leáll. Ez utóbbit hívjuk terminációnak. A lipid peroxidációs folyamat a zsírsavak fragmentációjához vezet. Az így képződött termékek még mindig igen reakcióképesek, bár már nem szabad gyökök. Közülük is kiemelkedik a malondialdehid és a 4-hidroxiialkenál. Mindegyik képes a fehérjék aminosoportjaival Schiff-bázist képezni, mely károsítja a fehérjék strukturáját.

#### 3.4.3. A víz- és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök (NO)

Legjelentősebb képviselője ezen csoportnak az NO, bár zsírolékonysága jobb mint a vízoldékonyága (az NO telített vizes oldata hozzávetőlegesen 3 mmol/l-es (32)). A helyes az lenne, ha a jelölésénél mindig feltüntetnénk az NO párosítatlan spinű elektronját is, azonban a mindennapi használatba enélküli rövidítése ment át.

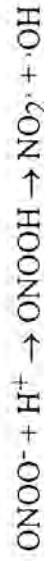


Tekintettel arra, hogy vizsgálataink legfontosabb objektuma az NO volt, és az elmúlt évek szabad gyök kutatásának új felfedezései is ehhez a gázhoz kötődnek, részletesebben foglalkozunk jellemzésével. Az NO, mint említettük, elsősorban a sejtek lipid kompartmentjében koncentráلódik, de ez a fázis sokkal kisebb a testben, mint a vizes fázis, ezért a molekula nagyobb része található vízdított formában. Nagy reakcióképességét jelzi az is, hogy élettartama szekundumos nagyságrendű (33). Hosszabb élettartamát az élő rendszerekben annak köszönheti, hogy tiol tartalmú molekulákhoz, elsősorban a glutation -SH csoportjához kötődik (34). Metallo-enzimekben az átmeneti fémekhez koordinációs kötéssel kapcsolódik (citokróم P450 (35), guanilat cikláz, haemoglobin, ciklooxigenáz, kataláz stb. (36)). Talán legjelentősebb ebből a szempontból a ferro ( $Fe^{2+}$ ) vashoz való kapcsolódása, amit elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópos detekciója során kihasználnak (37). A klinikai gyakorlatból a nitroprusszid nátrium említendő, amelyben az NO komplex kötésben van, és ahonnan redukáló hatásokra szabadul fel (38). Az NO molekula az egyik legfontosabb direkt vazodilatátor szerünk. Különösen nagy sebességgel reagál el a szuperoxid szabad gyökkel, miközben peroxinitrit képződik (39).



/4/

A peroxinitrit élettartama szintén rövid ( $t_{1/2} = 0,5$  sec), hidroxil és nitrogén dioxid ( $NO_2 \cdot$ ) szabad gyökké alakul.



/5/

Mindkettő lényegesen toxikusabb szabad gyök mint az NO, a peroxinitrit kifejezett tiol oxidációs hatással rendelkezik, mely károsítja a sejteket (40).

A szervezetben az NO termelése enzim katalizálta folyamat. A nitrogén monoxid szintáz (NOS) két fő típusát különböztetjük el, a konstitutív (cNOS) és az indukálható (iNOS) enzimet. Továbbá két különféle konstitutív izoenzim ismert, a neuronális (nNOS) és az

endothelialis NOS (eNOS). Az általunk is vizsgált konstitutív enzim kalciummal aktiválható. Mind citoszolikus (nNOS), mind membránokhoz kötött formája (eNOS), ami az endothel sejtekben és a thrombocytákban fordul elő) ismert. A cNOS aktiválódása rövid időtartamú, pikomólos nagyságrendű NO termeléssel jár. Az iNOS általában kalcium independentens, hosszan (órákig) tartó NO termelés jellemzi, nanomólos koncentrációban produkál NO-t, és az enzim különböző indukciók hatására (lipopoliszaharid, citokinek: TNF-alfa, IL-1) expresszálódik, amit a glukokortikoidok gátolni képesek. Mindkét típusú NOS szubsztrátja az arginin, kofaktora a NADPH (41).

A cNOS által termelt NO fiziológias funkciói a vazodilatáció (parakrin hormonhatásként az endothelialis NO esetében), a thrombocyta aggregáció gátlása (endokrin hormonhatásént, ha az endothelium által termelt NO hatását tekintjük, és autokrin hormonhatásként, ha a thrombocyta által termelt saját NO kiváltotta hatást vesszük figyelembe), és a neuronális ingerület-transzmisszió. Hatását a guanilat cikláz aktiválásán keresztül fejtí ki, ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) által kiváltott fehérje foszforilációkon keresztül. Ezek a hatások összességükben, többek között, kiváltják a citoplazmatikus, ionizált és diffuzibilis kalcium szintjének csökkenését is (42, 43, 44, 45).

Az indukálható izoenzim által termelt NO az egyidejűleg termelt  $O_2^{\cdot-}$ -al peroxinitritet képez, ami, többek között, fontos része a sejtes immunitás folyamatának is, infektív ágenseket és idegen sejtet ölő aktivitása miatt (46).

A cNOS által termelt NO fontos funkciója lehet, hogy lipidoldékonysága révén bekerülve a biológiai membránokban, az ott zajló lipid peroxidációs folyamat propagációját meggátolhatja az alkoxil és a peroxil gyökökhöz való kötődés révén (47).

#### 3.4.4. Nem-szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben

A szuperoxid szabad gyök dízmutációjával képződő *hidrogén peroxid* ( $H_2O_2$ ) nem rendelkezik párosítatlan spinű elektronnal, de, mint láttuk, a szabad gyökök képződésében és átalakulásában központi szerepet játszik. Igen erős oxidálószer (48) különösen átmeneti fémek jelenlétében.

Itt kellene említést tenni a *peroxinitritről* is (amelynek jellemzőit azonban a nitrogén monoxidal (NO) foglalkozó pont alatt már részleteztük), mert NO és  $O_2^-$  szabad gyök egymásra hatásából keletkezik (49).

További élettani folyamatokat befolyásoló erős oxidáló szer a *hypoklorit* (HOCl) amit a sejtes immunológiai védőrendszer termelt (50).

Az alapállapotában gyökös, biradikális oxigénből fénygerjesztéssel képződő, nem gyökös intermedier a *szingulet oxigén* ( $^1O_2$ ), amely a Haber-Weiss reakció átmeneti terméként is képződhet (51).

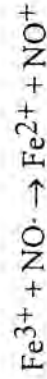
#### 3.4.5. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban

A vas a szervezetben különböző módon „becsomagolt” formában fordul elő (52). Ennek magyarázata abban lelhető meg, hogy a vas ferri ( $Fe^{3+}$ ) alakja nagyon rosszul oldódik vízben, a ferro forma pedig az oxigénnel reakcióba tud lépni, és így, szabályozatlan módon, szuperoxid szabad gyök keletkezéséhez vezethet. A vasat szállító (transzferrin, laktoferrin) és raktározó (ferritin) fehérjék finoman szabályozott rendszere megakadályozza a kontrollálhatatlan ferri redukció kialakulását, illetve a ferro oxigénnel való reakcióját (53). A fehérjék védő hatása nem irreverzibilis, szuperoxid szabad gyök ugyanis képes vasat felszabadítani a ferritinből (54). Ez fiziológias körülmények között is lejátszódik, hiszen az így mobilizált vas felhasználódhat pl. a haem szintéziséhez. Oxidatív stress során pathológiás

koncentrációban szabadul fel az ún. alacsony molekulású vas, amely talán Fe-ATP, Fe-ADP, Fe-citrát vagy egyéb Fe-komplexet jelent az intracelluláris kompartmentben. Ezek a vas komplexek pathológiásan magas koncentráció esetén a sejtek elektron transport rendszereitől (mitokondriális légzési lánc, citokróm P450 típusú enzimek, oxigenáz enzimek stb.) elektront vesznek fel, és így a ferri vas ferro vassá redukálódik, ami részben ismét szuperoxid szabad gyököt, részben lipid peroxidációt válthat ki (55).

A közelmúltban azt is leírták, hogy a ferri vasat az NO is redukálni képes ferro vassá

(56):



/6/

#### 3.4.6. Szabad gyök-képződés diabetes mellitusban

Számos adat igazolja, hogy a diabeteses kísérletes állatmodellekben a szabad gyök elfogók (scavenger), vitaminok, antioxidánsok koncentrációja csökken. Így például alacsonyabb aszkorbinsav (57) és E vitamin (58) szintek mérhetők a kísérleti állatokban, de ugyanezen eltérések megfigyelhetők diabeteses betegek plazmájában és sejteiben is (59). Így a diabeteses betegek sejtei érzékenyebbek mind a lipid peroxidációval (E vitamin hiány), mind a vízdékony szabad gyökök (aszorbinsav hiány) károsító hatásával szemben. A redukált glutation hiánya fokozza mind a zsiroldékony, mind a vízdékony szabad gyökök toxicitását. Ugyanakkor a diabeteses állapotra jellemző a fokozott szabad gyök termelés, például a lipid peroxidáció (60) és az emelkedett szuperoxid gyök produkció (61). Tehát a defenzív tényezők hiánya és az agresszív tényezők fokozott volta együttesen hozhatja létre az oxidatív stresszt diabetes mellitusban.

Diabetesben számos mechanizmus révén jöhet létre fokozott lipid peroxidáció és szuperoxid szabad gyök vagy hidrogén peroxid termelés. A glukóz autooxidációja (62), a

prostaglandin anyagsere változása (63), a protein-glikáció (64), és az úgynevezett hyperglycaemiás pseudohypoxia (65) érdemel említést. A glukóz autooxidációját és a protein glikáció következtében kialakuló szabad gyök termelést jelentősen befolyásolja a szöveti, és az intravazális vas jelenléte és állapota, mivel a vas kitűnő katalizátora ezen folyamatoknak (66). Az is ismert, hogy a vas anyagsere megváltozik, és feltehetően a redox ciklusban ( $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ ) résztvevő reduktilis vas szintjének emelkedése mellitusban a folyamatok jellemző faktora (67). A diabetesben felgyorsul a prostaglandin  $\text{G}_2$  átalakulása  $\text{H}_2$ -vé, és ez a szuperoxid szabad gyök termelés fokozódását eredményezi (68).

A hyperglycaemiás pseudohypoxián azt értjük, hogy a hyperglycaemia hatására megemelkedik a  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  arány, ami az igazi hypoxiát is jellemzi, és ami mind lipid peroxidációhoz, mind pedig szuperoxid szabad gyök termeléséhez vezet (65). Az oxidatív stressz fontos következménye az LDL oxidációja (69) és a membránok heparán szulfát vesztese, ami nem csak a erek falát károsíthatja, de hozzájárulhat a diabeteses nephropathia kialakulásához is (70).

### 3.4.7. Antioxidánsok

Antioxidánsok azok a molekulák amelyek a szabad gyököket kevésbé toxikus nem-gyökös molekulákká alakítják, míg önmaguk szabad gyökké válnak. Ezek az antioxidánsból képződő gyökök kevésbé toxikusak, mint az eredeti anyag, és további átalakulások során egy másik antioxidáns molekulával reagálva az élő szervezet kaskádszerűen detoxifikálja az eredeti reaktív oxigén intermediereket.

*A keringésben található legfontosabb antioxidánsok és hatásmechanizmusuk:*

1. A haptoglobin megköti a szabad haemoglobint és haemint és így megakadályozza, hogy a haemin a széteső vörösvértestekből a keringésbe és onnan pl. az endothelsejtekbe jusson, és ott oxidációt indítson el (71).

2. A transferrin, a lactoferrin és a caeruloplasmin a vas megkötése és redox ciklusának gátlása révén gátolja a szabad gyök képződést (72).

3. A húgysav (73) a  $\beta$ -karotin (74) és az E vitamin (75) gátolja a lipid peroxidációt.

4. A C vitamin a hidroxil szabad gyök scavengere (76).

5. A glutation mind a vízdékony mind a zsírdékony szabad gyökök elfogójaként szerepelhet, bár plazma szintje igen alacsony (0,5-2  $\mu\text{mol/l}$  közötti (77, 78)).

6. A sejtek extracelluláris felszínéhez kötötten található a szuperoxid dizmutáz (SOD), amely a szuperoxid-hidrogén peroxid átalakulást katalizálja (79).

*Az intracellulárisan ható antioxidáns rendszerek:*

1. Itt is megtalálhatók az előzőekben említett vitaminok, az A, C, E vitamin, hasonló hatás spektrummal (80).

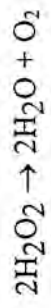
2. Itt is fontos szerepet játszik a glutation, különösen azért, mert egy NADPH-dependens enzim (a glutation reduktáz) ebben a kompartmentben végzi az oxidált glutation (GSSG) visszaredukálását. A NADPH-t a pentóz foszfát shuntben a glukóz 6-foszfát dehidrogenáz és a 6-foszfó-glukonát dehidrogenáz biztosítja a NADP<sup>+</sup> redukciója révén. A glutation egyben szubsztrája a glutation peroxidáznak is, amely nemcsak a hidrogén peroxidot, hanem a lipid peroxidokat is elbontja. A glutation peroxidáz aktiválásához szelénre is szükség van (81).

3. Az intracelluláris SOD hasonlóan a extracellulárishoz, a szuperoxid-hidrogén peroxid átalakulást katalizálja (82):



/5/

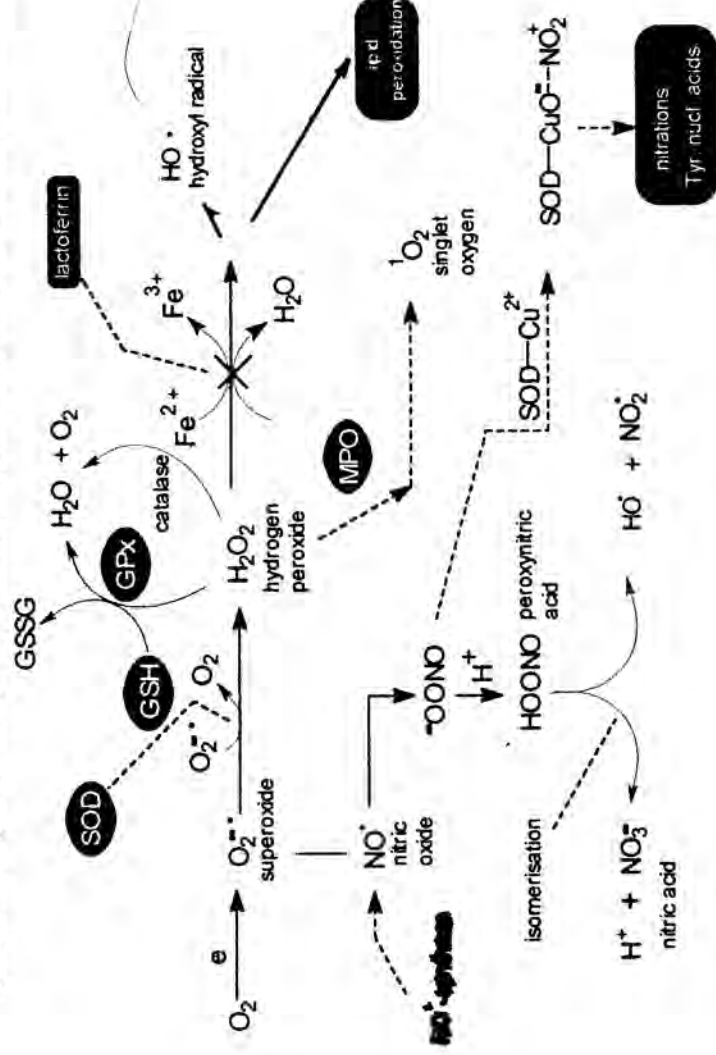
4. A hidrogén peroxid lebontását nem csak a glutation peroxidáz, hanem a kataláz is végzi (83):



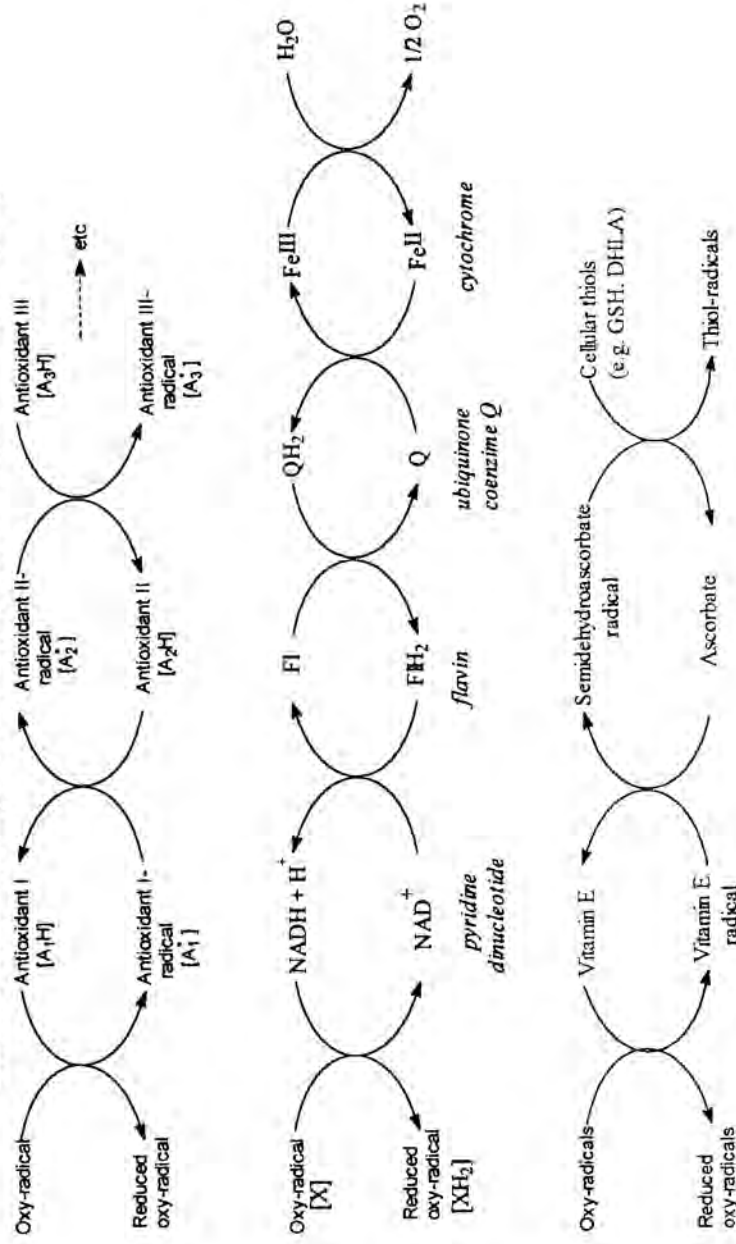
/6/

A szabad gyökökkel kapcsolatos ismereteket szemléltetjük összefüggéseiben az alábbiakban (prof. dr. Hídeg Kálmán előadási nyomán):

**Reaktive Oxigén és Nitrogen Intermedierek (ROI, RNI) biológiai redox folyamatokban**



**Kaszkádszerek [Antioxidánsok, Koenzimek, Vitaminok, Tiolok]**





#### 4. MUNKAHYPOTHESIS

Irodalmi és saját eredményeink is arra utaltak, hogy az inzulin intracelluláris másodlagos hírvivője az NO lehet. Az érdeklődésünk középpontjában álló diabeteses szövődmények (érkomplikációk, nephropathia) szempontjából különösen fontosnak tűnt az endothel sejt, és a thrombocyta. Egyrészt ezek állapota jelentős mértékben meghatározza a parenchymás szervek működését, másrészt mindkettőben ugyanaz az eNOS mutatható ki. Ezért thrombocyta és endothel sejt-modell felhasználásával dolgoztunk.

*Az alábbi hypothesiseket állítottuk fel:*

1. Az inzulin az eNOS aktivitásának megváltoztatásán keresztül fejti ki a hatását.
2. Az inzulin jel-átvitelt rontják mindazok a tényezők, amelyek az eNOS rendszer működését károsítják.
3. A szervezetben pathophysiológias viszonyok között nagyobb mennyiségben termelt szabad gyökök szerepet játszanak az NO jel-átvitel módosításában, hiszen ezek megakadályozzák, hogy az NO kifejtsse hatását a guanilát cikláz enzimem.

## 5. MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK

### 5.1. Az inzulin másodlagos hírvivője az NO

#### 5.1.1. Izolált békaszív modell (thesis I)

Időrendi és logikai sorrendben is első vizsgálatunk alapján 1987-ben közölt cikkünkben elsőként írtuk le, hogy a metilénkék eliminálja az inzulin hatását. Ekkor az extracelluláris kálium ion koncentráció változásait tanulmányoztuk ionszelektív elektródával, amely módszert korábban vázizmon dolgoztunk ki és írtunk le. A vizsgálatok elvégzésekor és a dolgozat megírásakor még nem volt ismert a metilénkék szuperoxid szabad gyök termelésen keresztül megvalósuló, nitrogén monoxidot hatástalanító effectusa.

#### 5.1.1.1. Módszer

Rana esculenta izolált szívéen, OP-K-711 (Radelkisz) típusú  $K^+$ -ionszelektív elektródával mértük a szív felszíni kálium ionváltozásait. Az izolált béka szívet gáz segítségével úgy rögzítettük az elektróda ionszelektív membránjához, hogy azzal érintkezzen. A szívet Ringer oldatba (pH 7,4) merítettük, amit levegővel folyamatosan átbuborékolattunk. A biológiaiailag aktív anyagok adagolása ebbe az oldatba történt. A Ringer oldat agar hidon keresztül közlekedett egy KCl tartalmú oldattal. A referencia, ezüst/ezüst klorid elektród ebbe a KCl oldatba került. A káliumszelektív elektróda potenciál változásait potenciométerrel (Radelkisz OP-205) mértük, és potenciometriás rekorderrel (Radelkisz OH-814) regisztráltuk. Minden mérést 10 alkalommal ismételtünk meg. Az általunk használt koncentrációk a következők voltak: metilénkék 0.1 mmol/l, inzulin 500 mE/ml, aszkorbinsav 0,1 mmol/l. A metilénkéket elektron akceptorként, az aszkorbinsavat elektron donorként alkalmaztuk. A metilénkék redox ciklusa során elektront vesz fel a sejtektől, leukometilénkékké alakul, majd

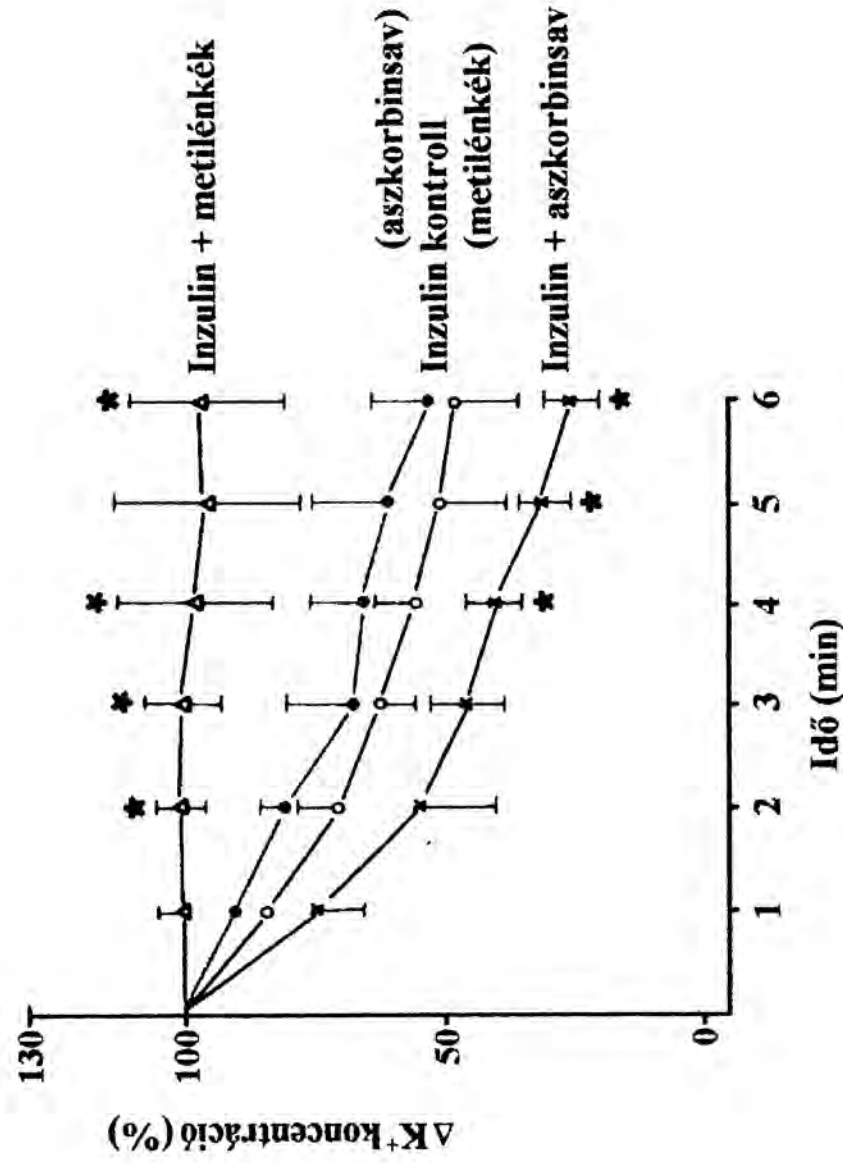
az elektront a levegő oxigénjének leadva visszaoxidálódik. Az oxigén ennek során szuperoxid szabad gyökké alakul át.

#### 5.1.1.2. *Eredmények*

Az 1. ábrán látható, hogy az inzulin hatására a felszíni  $K^+$  ion koncentráció 6 perc alatt majdnem a felére esett. Aszkorbinsav ezt a hatást kissé erősítette. Metilénkék jelenlétében az inzulin hatása teljesen megszűnt.

#### 5.1.1.3. *Összefoglalás*

A szuperoxid szabad gyök keltő metilénkék kivédte az inzulin gátlását az izolált békaszív kálium kiáramlása vonatkozásában.



1. Ábra. Metilénkék teljes mértékben gátolja a kálium ionáramokra kifejtett inzulinhatást izolált békaszíven. ● = inzulin kontroll (aszkorbinsav számára), ○ = inzulin kontroll (metilénkék számára), × = inzulin + aszkorbinsav, Δ = inzulin + metilénkék.

### 5.1.2. *Thrombocyta ATP secretios modell (thesis II, III)*

Az izolált békaszíven végzett vizsgálataink, az újabb irodalmi adatok alapján, arra utaltak, hogy az inzulin bizonyos hatásai nitrogén monoxidon keresztül mediálódnak. Feltételezésünk igazolására egy, a humán viszonyokhoz közelebb álló modellt dolgoztunk ki, melynek során egészséges egyének thrombocyta dús plazmáját használtuk fel. Az adrenalin által kiváltott ATP secretiot inzulinnal moduláltuk, és ezen inzulin effectust vizsgáltuk a nitrogén monoxid szintáz enzim szubsztrátjával, argininnel, és az enzim kompetitív antagonistájával, N<sup>G</sup>-nitro-L-argininnel (L-NA).

#### 5.1.2.1. *Módszerek*

Az epinephrint (amelyet 0,01 N sósavban oldottunk), az L-arginint, az N<sup>G</sup>-nitro-L-arginint (L-NA), az ATP-t, a luciferáz-luciferint (glicin pufferben), a humán rekombináns inzulint a Sigma Chemical Co-tól rendeljük (St. Louis, Mo. USA), a vacutaineret a Becton-Dickinsontól (Rutherford, NJ, USA) vettük. Az L-NA-t fiziológias sóban oldottuk 50 °C-on 30 percig tartó keveréssel. Az inzulint NaOH-al lúgosított NaCl-ban oldottuk. Az epinephrint is tartalmazó thrombocyta-dús plazma pH-jában eltérést nem észleltünk az inzulin megfelelő hígításának bemérése után.

Egészséges önkéntesektől, 12 órás éhezés után, vért vettünk citrátos vacutainerbe. Az önkéntesek a vérvétel előtti két hét során nem kaptak gyógyszert. Az irodalomban leírt módszer szerint thrombocyta-dús (PRP) és thrombocyta-szegény plazmát (PPP) preparáltunk az alábbiaknak megfelelően: a citrátos vért 15 percig, szobahőmérsékleten 250 x g-vel centrifugáltuk, hogy PRP-t nyerjünk, majd 5 percig 14.000 x g-vel centrifugáltuk hogy PPP-t kapjunk. A thrombocyta számot meghatároztuk (System 9010, Serono-Baker Diagnostics, Inc. Allentown, PA, USA), majd 200.000 és 300.000/μl közé állítottuk be. Az ATP szekréciót

3,13  $\mu\text{mol/l}$  epinephrinrel indítottuk el, 500  $\mu\text{l}$  végvolumenben, 37 °C-on. Az epinephrin kiváltotta ATP szekréció mérésére Chrono-Log 400-VS (Chrono-Log Co., Havertown, PA, USA), chemilumineszcenciás csatornával is ellátott aggregométert használtunk.

Az inzulinnal, L-argininnel, L-NA-val végzett kísérletekben a PRP-t ezen anyagokkal 10 percig, 37 °C-on előinkubáltuk. A koinkubációs mérések esetében a különböző konstituenseket egyszerre adtuk a PRP-hez és ezután 10 percig előinkubáltunk. Minden kísérletet háromszor végeztünk el, három önkéntes mintáján.

Az ATP szekréciót a luciferáz-luciferin metódika segítségével mértük. 40 mg luciferáz-luciferint mértünk be 1 ml-re, ebből a törzsolatból 50  $\mu\text{l}$ -t adtuk 450  $\mu\text{l}$ -hez, 1 perccel az epinephrin adagolása előtt. ATP és luciferin jelenlétében a luciferáz fénykibocsátást indukál. A chemilumineszcens csatorna érzékenységet 0,05 és 0,2 között változtattuk. Az ATP szekréció vizsgálatát standard ATP hozzáadása után állítottuk le. Három független mérést végeztünk, az átlagot és a szórást (SD) számoltuk ki az epinephrin-kontroll maximális ATP szekréciójának százalékában (MS).

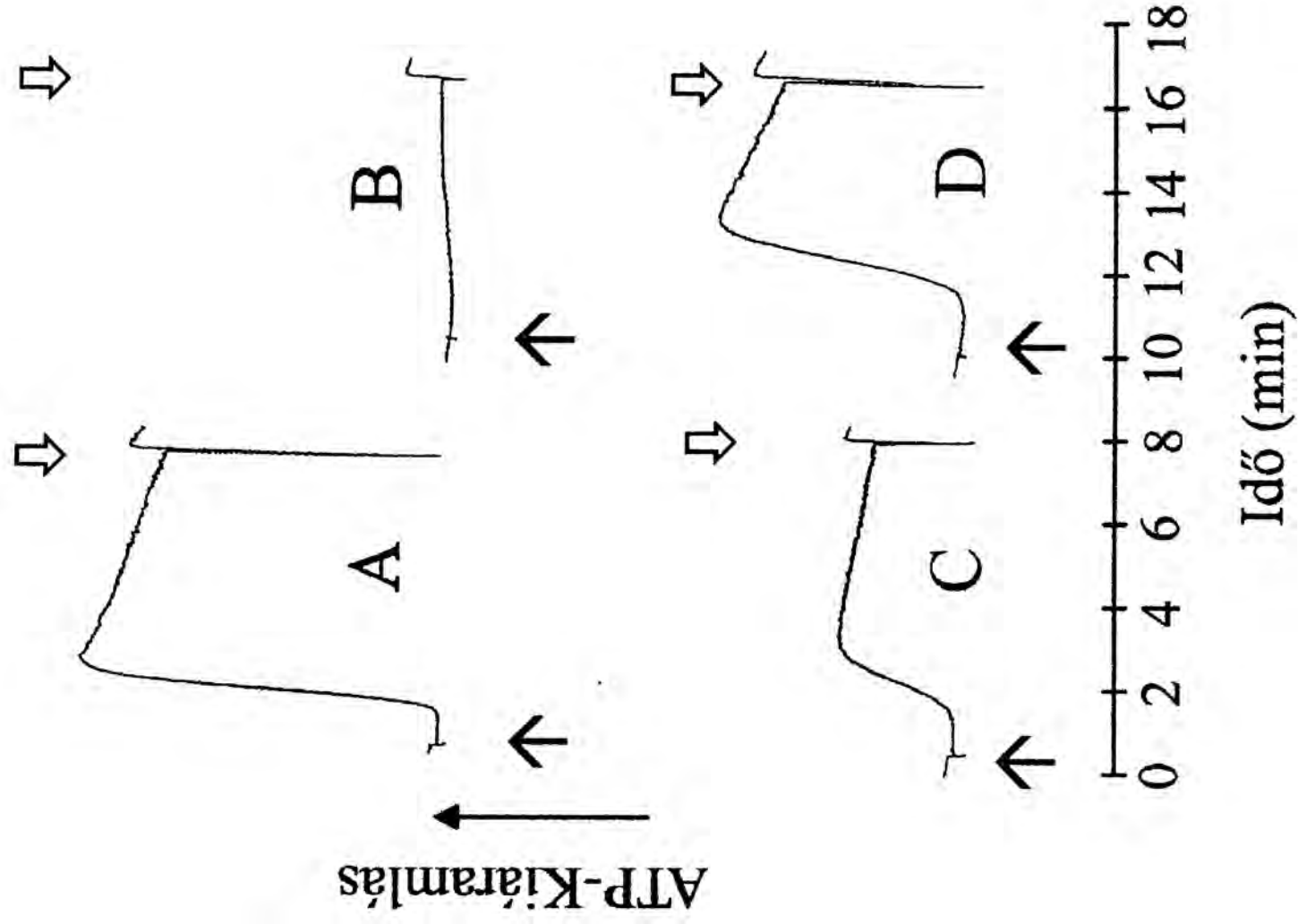
#### 5.1.2.2. *Eredmények*

Az inzulín okozta ATP-szekréció-gátlást az 2. ábra mutatja. 12  $\mu\text{mol/l}$  inzulín teljesen leállította az ATP szekréciót (2. ábra, B, MS: 5,3 $\pm$ 1,5 %). 3  $\mu\text{mol/l}$  inzulín csak gyenge gátlást okozott (2. ábra, D, MS: 83,0 $\pm$ 7,5 %). 60 mmol/l L-arginin (3. ábra, B, MS: 9,6 $\pm$ 4,9 %) hasonló mértékű gátlást eredményezett, mint 12  $\mu\text{mol/l}$  inzulín. 20 mmol/l L-arginin nem befolyásolta jelentősen az ATP szekréciót (3. ábra, D, 84,8 $\pm$ 12,7 %). A 4. ábra az L-NA által kiváltott ATP szekréció-gátlást mutatja. Az ATP felszabadulás gátlása nem volt teljes 16 mmol/l L-NA-val (4. ábra, B, MS: 42,6 $\pm$ 7,1 %) és fokozatosan csökkent az inhibíció, 0,4 mmol/l esetében már 79,6 $\pm$ 7,1 % volt az MS értéke( 4. ábra, D). L-arginin (20 mmol/l, 5.

ábra, B, MS:  $84,8 \pm 12,7$  %), és inzulin ( $3 \mu\text{mol/l}$ , 5. ábra, C, MS:  $83,0 \pm 7,5$  %) koinkubációja potenciáló gátlást eredményezett (5. ábra, D, MS:  $5,8 \pm 2,7$  %). L-NA ( $16 \text{ mmol/l}$ , 5. ábra, E, MS:  $42,7 \pm 7,1$  %) önmagában csökkentette az ATP szekréciót, így nem meglepő, hogy L-arginin + inzulinnal együtt inkubálva komplett gátlást okozott (5. ábra, F, MS:  $2,6 \pm 1,0$  %).

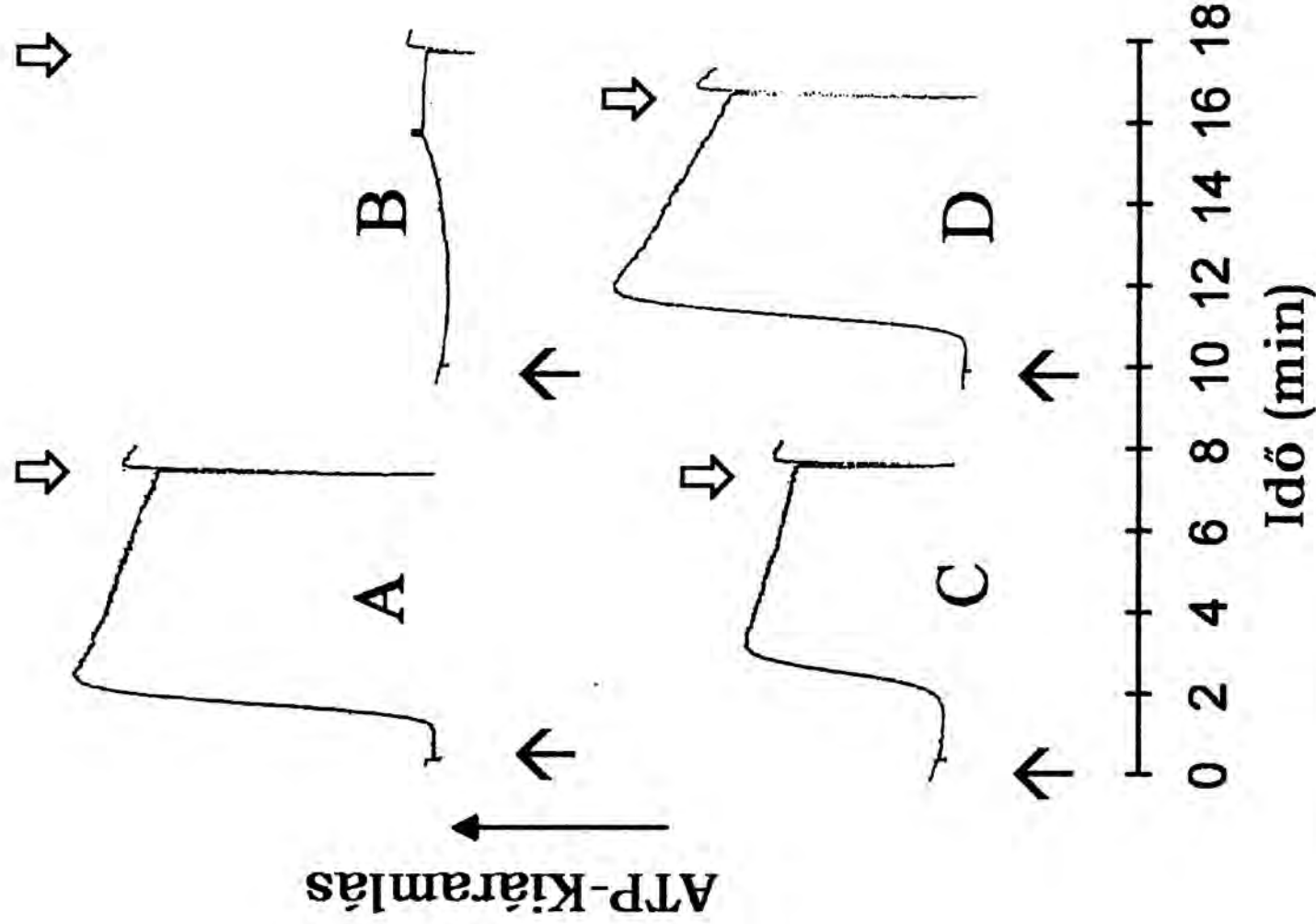
### 5.1.2.3. Összefoglalás

A thrombocyta ATP secretio inzulin-kiváltotta gátlását a nitrogén monoxid szintáz enzim szubsztrát arginin potenciózta.

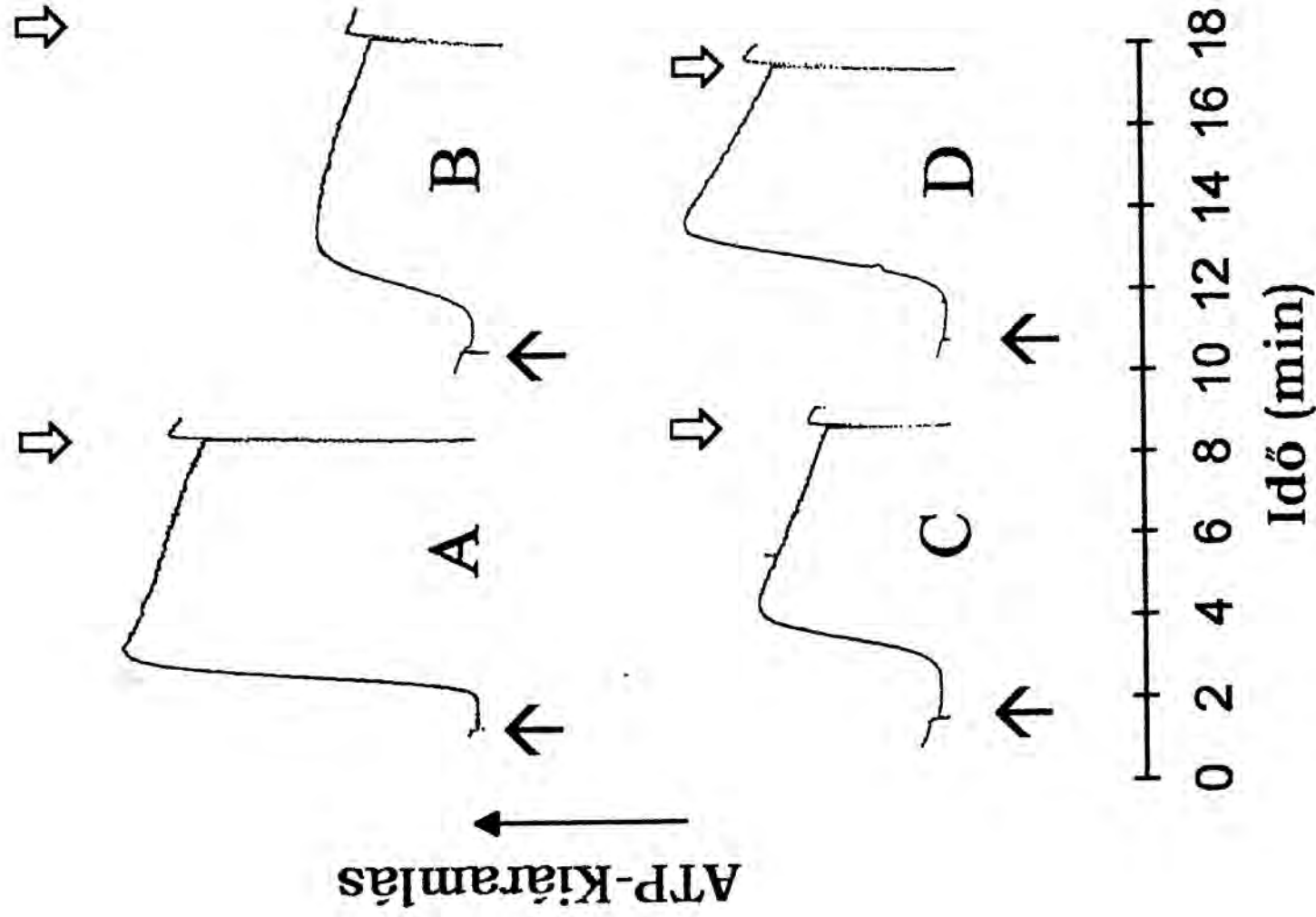


2. Ábra. Az epinephrin-kiváltotta thrombocytá ATP-secretio gátlása inzullinnal.  
 A = epinephrin kontroll, B = 12  $\mu\text{mol/l}$  inzulin, C = 6  $\mu\text{mol/l}$  inzulin, D = 3  $\mu\text{mol/l}$  inzulin.  $\uparrow$  = 3,13  $\mu\text{mol/l}$  epinephrin,  $\downarrow$  = 250 nmol/l végkoncentrációjú ATP standard.

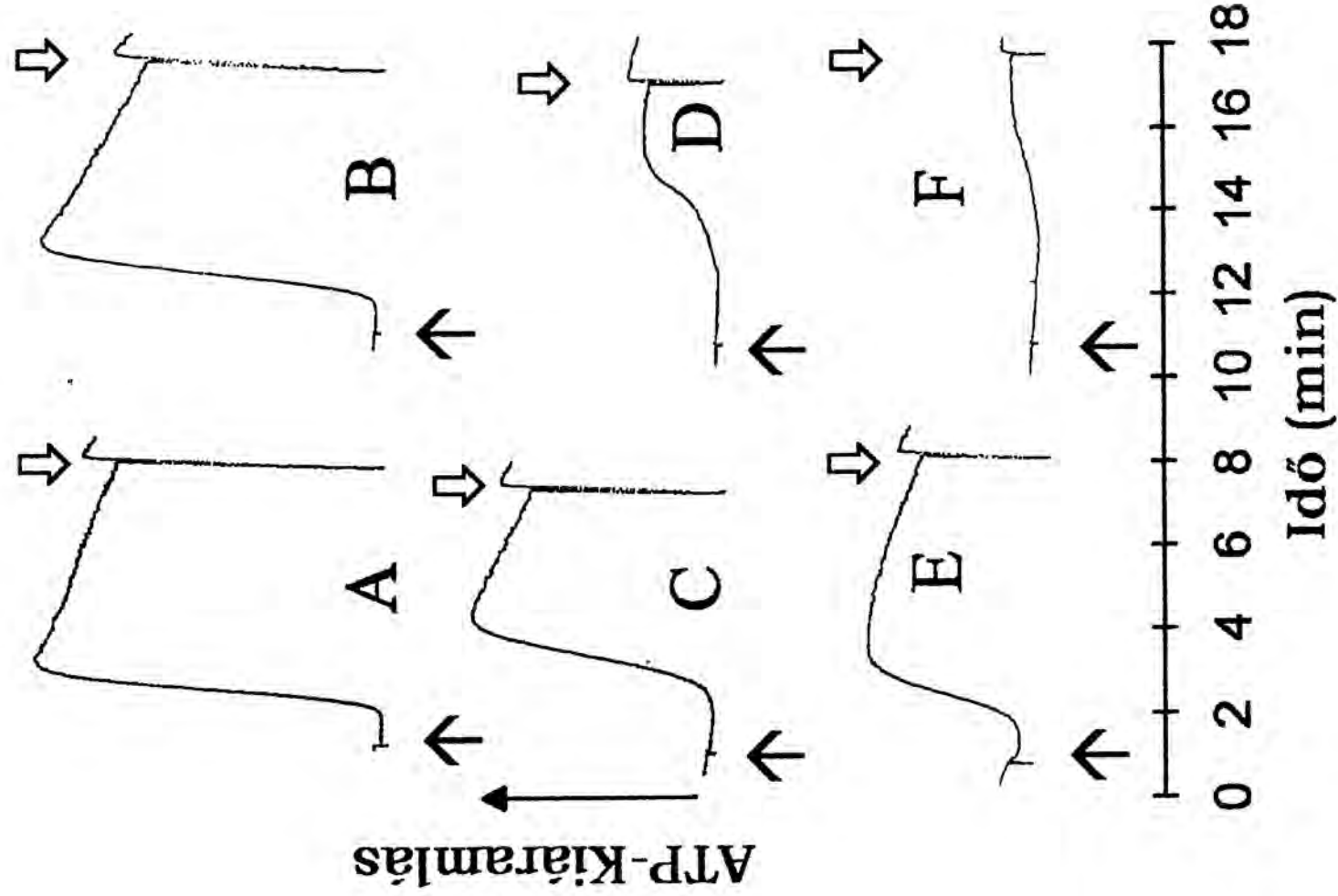




3. Ábra. Az epinephrin-kiváltotta thrombocytá ATP-secretio gátlása argininnel.  
 A = epinephrin kontroll, B = 60 mmol/l arginin, C = 40 mmol/l arginin, D = 20 mmol/l arginin.  $\uparrow$  = 3,13  $\mu$ mol/l epinephrin,  $\downarrow$  = 250 nmol/l végkoncentrációjú ATP standard.



4. Ábra. Az epinephrin-kiváltotta thrombocytá ATP-secretio gátlása N<sup>G</sup>-nitro-L-argininrel (L-NA). A = epinephrin kontroll, B = 16 mmol/l L-NA, C = 4 mmol/l L-NA, D = 0,4 mmol/l arginin. ↑ = 3,13 μmol/l epinephrin, ↓ = 250 nmol/l végkoncentrációjú ATP standard.



5. Ábra. Az epinephrin-kiváltotta thrombocyta ATP-secreció gátlása inzulinnal, argininnal és N<sup>G</sup>-nitro-L-argininnel (L-NA). A = epinephrin kontroll, B = 20 mmol/l arginin, C = 3 μmol/l inzulin, D = 20 mmol/l arginin + 3 μmol/l inzulin, E = 16 mmol/l L-NA, F = 20 mmol/l arginin + 3 μmol/l inzulin + 16 mmol/l L-NA, ↑ = 3,13 μmol/l epinephrin, ↓ = 250 nmol/l végkoncentrációjú ATP standard.

### 5.1.3. Kemilumineszcenciás eljárás (thesis IV. V. VI)

Az 5.1.1. és 5.1.2. pont alatt említett módszerekkel csak indirekt módon lehet igazolni az NO szerepét az inzulin hatásának kifejlődésében. Ezért a továbbiakban az NO direkt kimutatására törekedtünk. Tekintettel arra, hogy az NO szabad gyök, párosítatlan spinű elektronja van, ezért direkt kimutatására két módszer lehet alkalmas, mint általában a szabad gyökök identifikálására, az elektron spin rezonancia (ESR) és a kemilumineszcencia. Az irodalomban említett spin trapping módszerrel metil-nitroso-propánt alkalmazva, az általunk vizsgált körülmények között nem tudtunk NO-t kimutatni. Ezért az ESR-nél jóval érzékenyebb luminol mediálta kemilumineszcenciás módszert állítottuk be.

#### 5.1.3.1. Módszer

A 5.1.2.1. pont alatt leírtak szerinti thrombocyta-dús plazma (PRP) modellt használtuk. A PRP-be 150  $\mu\text{mol/l}$  luminolt tettünk, ami vasfüggő- és vastól független oxidáció hatására fényt bocsát ki. A vasfüggő kemilumineszcenciát, ami lehet lipíd peroxidáció vagy hidroxil szabad gyök eredetű, dezferrioxamin (150  $\mu\text{mol/l}$ ) hozzáadásával gátoltuk. A dezferrioxamin komplexálja a ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) vasat, és így gátolja a ferri-ferro ( $\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}$ ) átalakulást. A lipíd peroxidációhoz és a hidroxil szabad gyök képződéséhez szükség van a vas redox ciklusára. A hidroxil szabad gyök, az ún. Fenton reakcióban, szuperoxid szabad gyök dizmutációjából eredő hidrogén peroxidból képződik vas jelenlétében. Tehát az általunk kidolgozott, dezferrioxamin tartalmú rendszerben csak a vastól független, peroxinitrit indukálta kemilumineszcencia keltett jelet. A peroxinitrit NO és szuperoxid szabad gyök egymáshatásából keletkezik. A kemilumineszcenciát LB 9505 típusú (Berthold, Wildbad, Germany) kemiluminométerrel detektáltuk. Annak igazolására, hogy az általunk alkalmazott dezferrioxaminos kezelés megátolta a vasfüggő luminol oxidációt, katalázt (1300 E/l) adagoltunk a rendszerhez, ami a hidrogén peroxid elbontása

révén gátolja a hidroxil szabad gyök képződését, illetve a lipidperoxidációt gátló vizoldékony E vitamin analógot, a Troloxot (0,2 mmol/l) és a butilált hidroxitoluént (BHT, 0,2 mmol/l) alkalmaztuk. Ha a dezferrioxamin hatékonyan gátolja a vasfüggő luminol oxidációt, akkor a kataláznak a Trolox és BHT kezelésnek inefektívnek kell lennie. Ha a kemilumineszcenciát valóban a peroxinitrit kelti, akkor annak szuperoxid dizmutáz és NOS antagonistá hatására csökkennie kell. A szuperoxid dizmutáz ugyanis a szuperoxid szabad gyököt hidrogén peroxiddá alakítja, a NOS antagonistá pedig meggátolja az NO képződését. A szuperoxid dizmutáz 36-144 E/l-es és az N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil észtert (L-NAME) 0,5-4 mmol/l-es koncentrációjában alkalmazzuk. A thrombocyták aktiválódása során a prosztaglandin termelés nagymértékben megnő, ami szabad gyökök termelésével jár együtt. Ezért a cyclooxygenáz inhibitor acetilszalicil savnak (0,05 mmol/l) a kemilumineszcenciára kifejített hatását is vizsgáljuk. A kemilumineszcenciás görbék alatti területet (AUC) lemérve, az egyes görbék alatti területeket egymáshoz viszonyítva százalékosan adtuk meg az eredményeket. Az átlagot és az SD-t számoltuk ki, a szignifikancia megítélésére Student t-tesztet használtunk.

### 5.1.3.2. Eredmények

Az inzulin koncentrációfüggő kemilumineszcencia növekedést okozott, mint az az eredeti regisztrátumokat tartalmazó 6. ábrán látható. Ha a 84 pmol/l koncentrációjú inzulin kiváltotta kemilumineszcenciás görbe alatti területet 100 %-nak vettük és ehhez viszonyítva ábrázoltuk a nagyobb koncentrációk okozta kemilumineszcenciát, akkor a 7. ábrán feltüntetett eredményekhez jutottunk. Látható, hogy a log. inzulin koncentrációtól függően lineárisan emelkedik az AUC értéke.

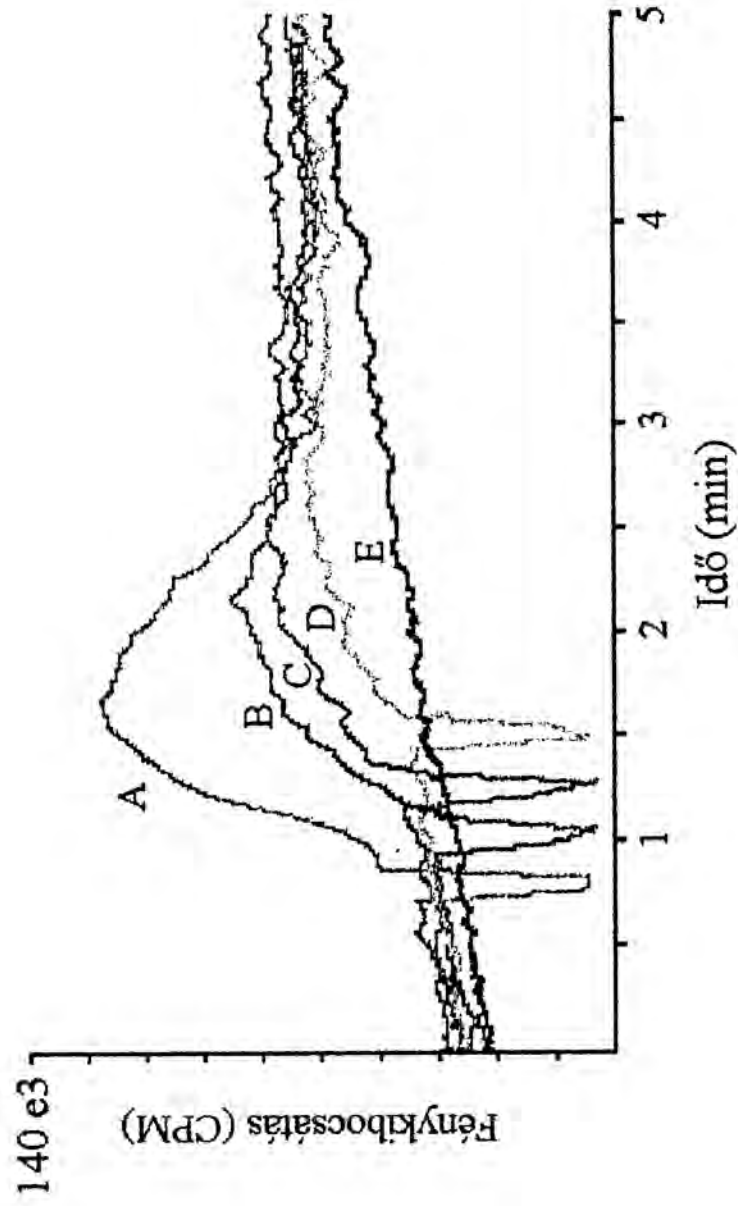
A kemilumineszcenciát nem befolyásolta a kataláz, a Trolox és a BHT (az ábrákon nem mutatott adatok). Tehát nem hidrogén peroxid, nem hidroxil szabad gyök (a kataláz elbontja a hidrogén peroxidot, ezáltal akadályozza a hidroxil szabad gyök képződését a Fenton

reakcióban) és nem lipid peroxidáció (mind a Trolox, az E vitamin vízoldékonyabb formája, mind a BHT gátolja a lipid peroxidációt) keltette a kemilumineszcenciát. Ugyancsak ineffektív volt az acetilszalicilsav, ami kizárja a prosztaglandin képződése során keletkezett szabad gyökök szerepét.

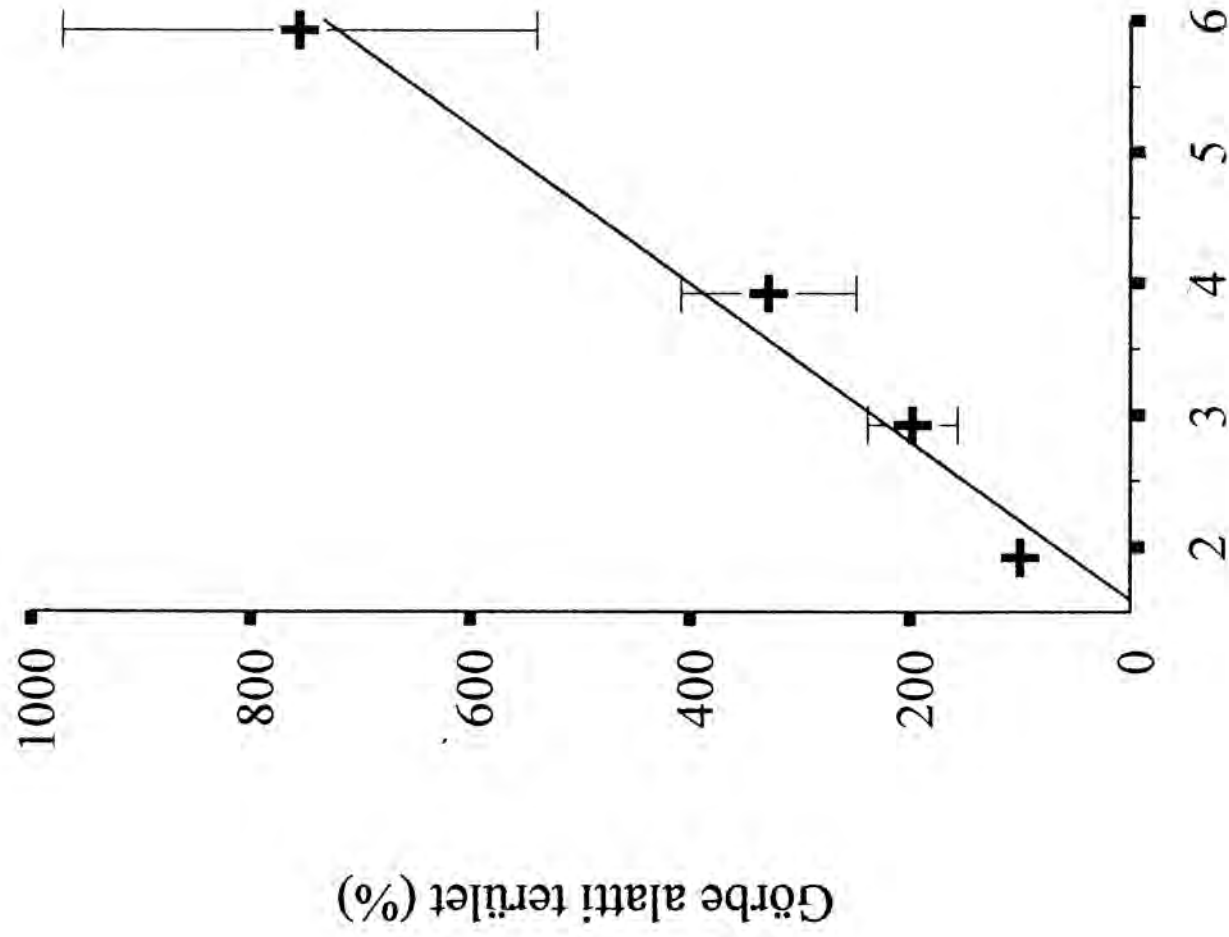
Hatékonyan csökkentette az inzulin indukálta kemilumineszcenciát a NOS enzim kompetitív antagonistája, az L-NAME (8. ábra). Az AUC-*ket* kiszámolva, a 840 nmol/l inzulin által kiváltott kemilumineszcenciás görbe alatti területet 100 %-nak véve látható, hogy az L-NAME koncentráció-függően csökkenti a kemilumineszcenciát (9. ábra). Hasonlóan az L-NAME-hez a szuperoxid dizmutáz enzim is koncentráció függően csökkentette a kemilumineszcenciát, melyet az eredeti regisztrátumokat tartalmazó 10. és a számított AUC értékek %-os arányát tükröző 11. ábrán mutatunk be.

### 5.1.3.3. *Összefoglalás*

Ezen vizsgálatainkkal direkt módon is tudtuk igazolni, hogy az inzulin hatására NO-t termelnek a thrombocyták. Az NO detektálását az NO-ból és az NO-val együtt termelődött szuperoxid gyökből keletkezett peroxinitrit mérése tette lehetővé.



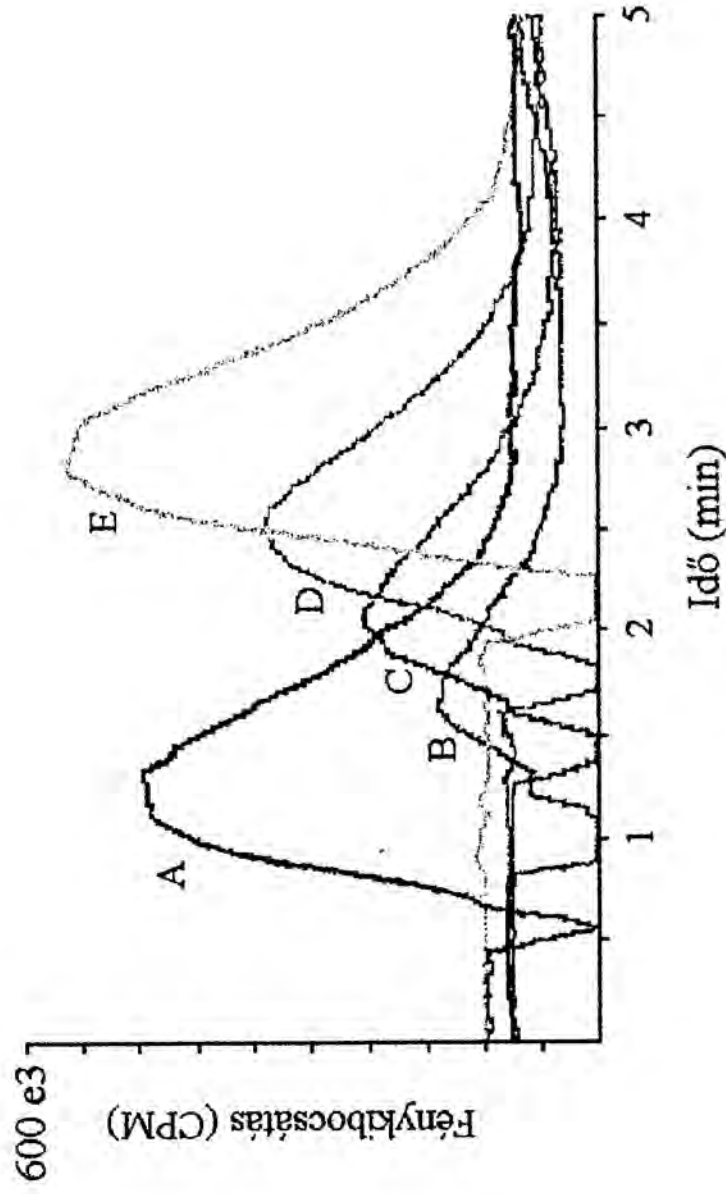
6. Ábra. Az inzulin koncentráció-függően növeli a thrombocyta-dús plazma luminol mediálta kemilumineszcenciáját. A = 840 nmol/l, B = 8,4 nmol/l, C = 840 pmol/l, D = 84 pmol/l inzulin, E = kontroll.



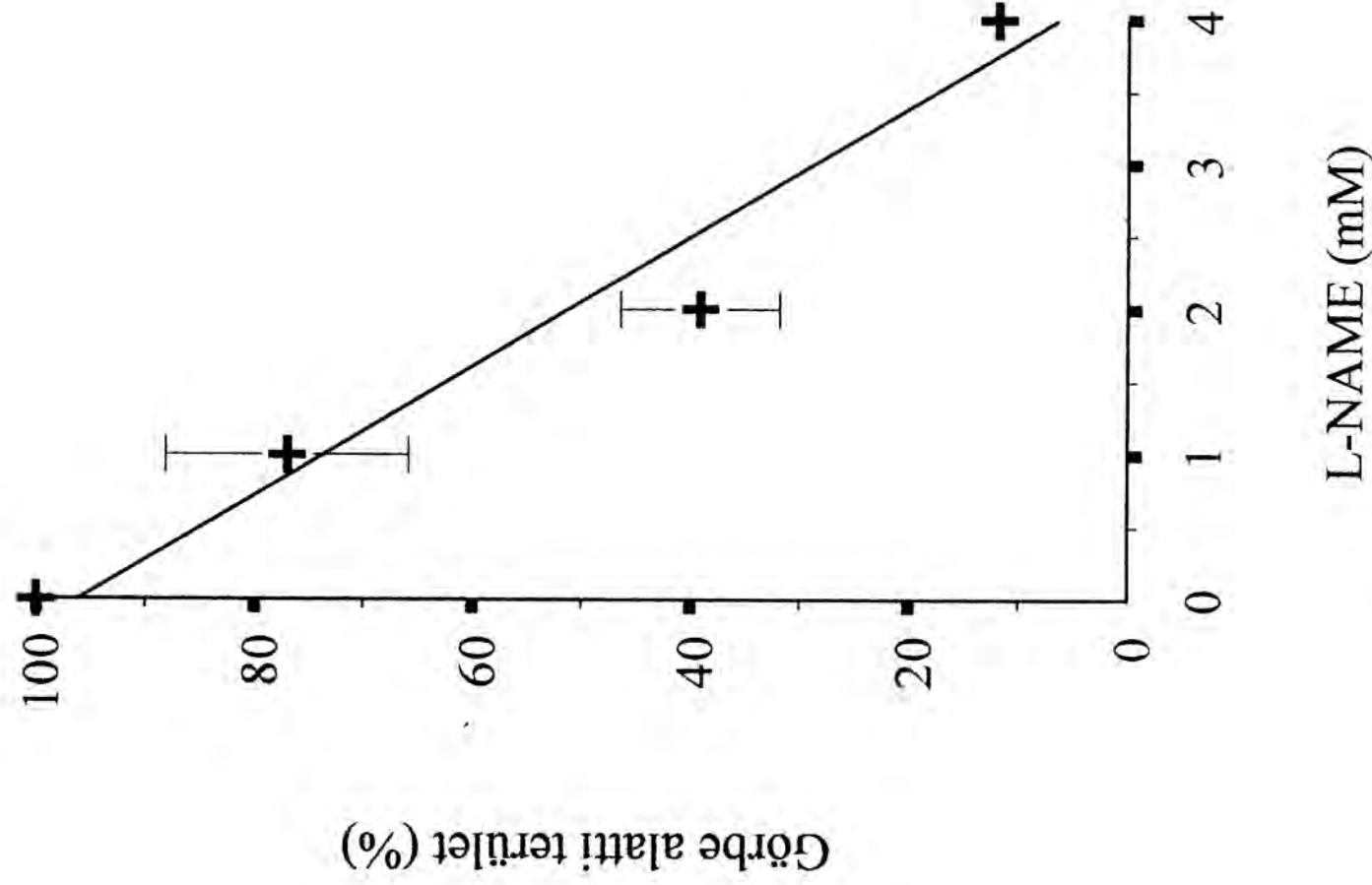
Log Inzulin (pM)

7. Ábra. Az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciás görbék alatti területek növekedése a logaritmus inzulin-koncentráció függvényében (n = 13).

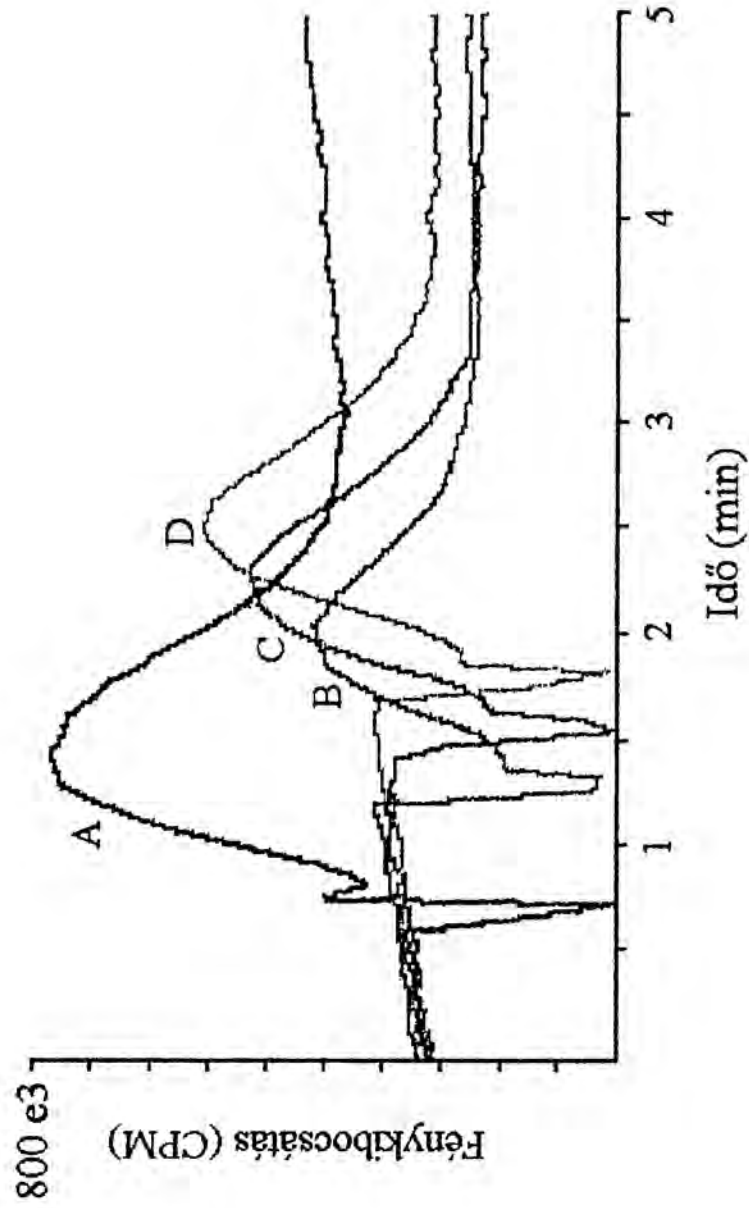




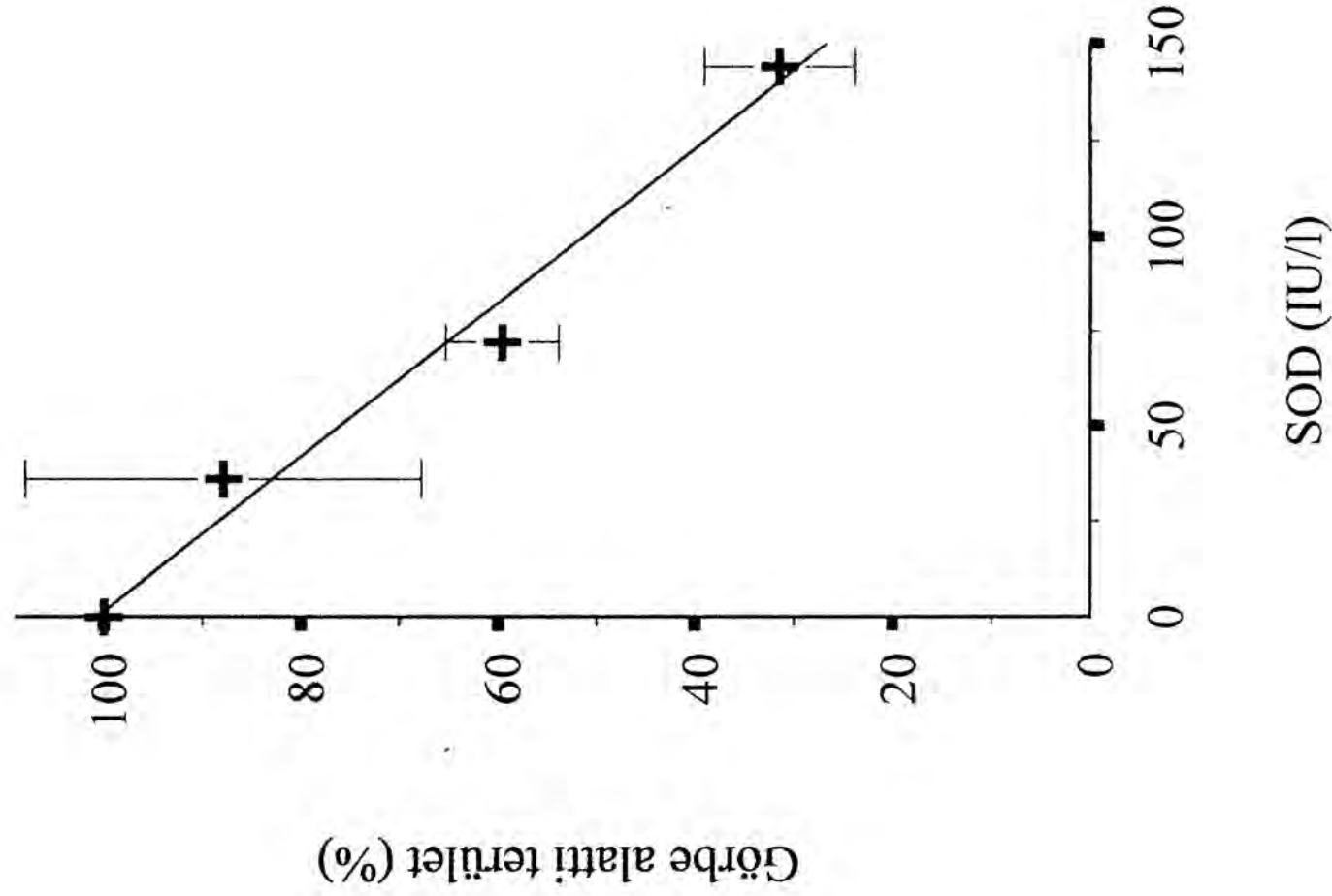
8. Ábra. A NOS enzim inhibitor  $N^G$ -nitro-L-arginin metil észter (L-NAME) gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára. A = inzulin-kontroll (840 nmol/l), B = 840 nmol/l inzulin + 4 mmol/l L-NAME, C = 840 nmol/l inzulin + 2 mmol/l L-NAME, D = 840 nmol/l inzulin + 1 mmol/l L-NAME, E = 840 nmol/l inzulin + 0,5 mmol/l L-NAME.



9. Ábra. A NOS enzim inhibitor  $N^G$ -nitro-L-arginin metil észter (L-NAME) gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára a kemilumineszcenciás görbék alatti területek arányában kifejezve ( $n = 13$ ).



10. Ábra. A szuperoxid dizmutáz (SOD) gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára. A = inzulin-kontroll (840 nmol/l), B = 840 nmol/l inzulin + 144 U/l SOD, C = 840 nmol/l inzulin + 72 U/l SOD, D = 840 nmol/l inzulin + 36 U/l SOD.



11. Ábra. A szuperoxid dizmutáz (SOD) gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára a kemilumineszcenciás görbék alatti területek arányában kifejezve (n = 13).

## 5.2. Az NO-jel inaktiválása

### 5.2.1. cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben *(thesis VII, VIII, IX)*

Az NO-cGMP rendszer érzékeny a sejteket ért oxidatív stresszre. Az NO termelődésének kimutatására a guanilat cikláz enzim aktiválódása során létrejövő cGMP felszabadulás mértékének meghatározását választottuk. A dohányfüst, mint említettük, acut inzulin rezisztencia syndroma szerű képet okozhat. A dohányfüst toxicus összetevői közül sokan szabad gyök tulajdonságúak (pl. a nitrogén oxidált származékai), mások, mint pl. a formaldehid, olyan elváltozásokat okoznak a sejtek antioxidáns védekező rendszerében, amelyek a sejteket a szabadgyökös behatásokra érzékennyé teszik. A formaldehid a redukált glutation szulfhidril csoportjához kötődhet, elfogyaszta így a szövetek egyik legfontosabb antioxidáns molekuláját. Ezáltal a sejtek SH-enzimeinek aktivitása megváltozik, például a NOS inaktiválódhat.

#### 5.2.1.1. Módszerek

Disznó aorta endothelsejt kultúrákat használtunk 5-6 napos tenyésztés után, akkor, amikor a növekedés során konfluálónak vált a tenyészet. A cigarettafüstöt Krebs pufferen keresztül buborékolattuk át, és ezt használtuk, mint cigaretta puffert (SB) a dohányzás hatásának modellezésére. A sejtek NO termelését bradikininnel indukáltuk. Az SB kezelés során, a bradikinin indukciót megelőzően, az SB különböző hígításaival előkezeltük a sejteket, illetve az időfüggés tanulmányozásakor ugyanazon SB koncentrációval különböző ideig preinkubáltuk. Az antioxidáns kísérletekben az SB adagolásával egyidejűleg történt az antioxidáns előkezelés. A sejtek sósavas (0,1 mol/l) extractumának cGMP koncentrációját határoztuk meg. Erre, minimális módosításokkal, a New England Nuclear kithoz mellékelt módszert használtuk. A cGMP koncentrációs adatokat a sejtfehérje koncentrációjának

függvényében fejeztük ki, a fehérje meghatározás Lowry szerint történt (84). Minden kísérletet 6 sejtvonalon végeztünk el. Az adatok átlagát és az SD-t számoltuk ki. A szignifikancia meghatározása a kétmintás Student t-próba használatával történt.

A dohányfüst formaldehid tartalmát a SB felhasználásával, a Nash reagens segítségével fotometriásan határoztuk meg 410 nm-nél mérve és standard formaldehid sort alkalmazva (n=8) (85)

A formaldehid SH- csoport fogyasztását úgy mutattuk ki, hogy 10 mmol/l GSH oldathoz növekvő koncentrációjú, maximum 10 mmol/l formaldehidet adtunk. 45 perc inkubáció után az oldatban jelenlévő maradék SH- csoportot az Ellman reagens alkalmazásával fotometriásan mértük 412 nm-nél (n=8).

### 5.2.1.2. Eredmények

A cGMP alapszintjét a bradikinin 100 nmol/l-es koncentrációja  $2,6 \pm 1,1$  nmol/mg protein bazális szintről  $8,8 \pm 2,4$  nmol/mg proteinre növelte. A bradikinin által kiváltott cGMP növekedést az SB, 30 perces inkubáció esetén, koncentrációfüggően csökkentette (12. ábra).

Az 50 %-os SB 10 perces inkubálása a sejtekben már szignifikáns cGMP csökkenést eredményezett, és 30 perces inkubálás után már mérhetetlenül alacsony volt a cGMP koncentrációja (13. ábra).

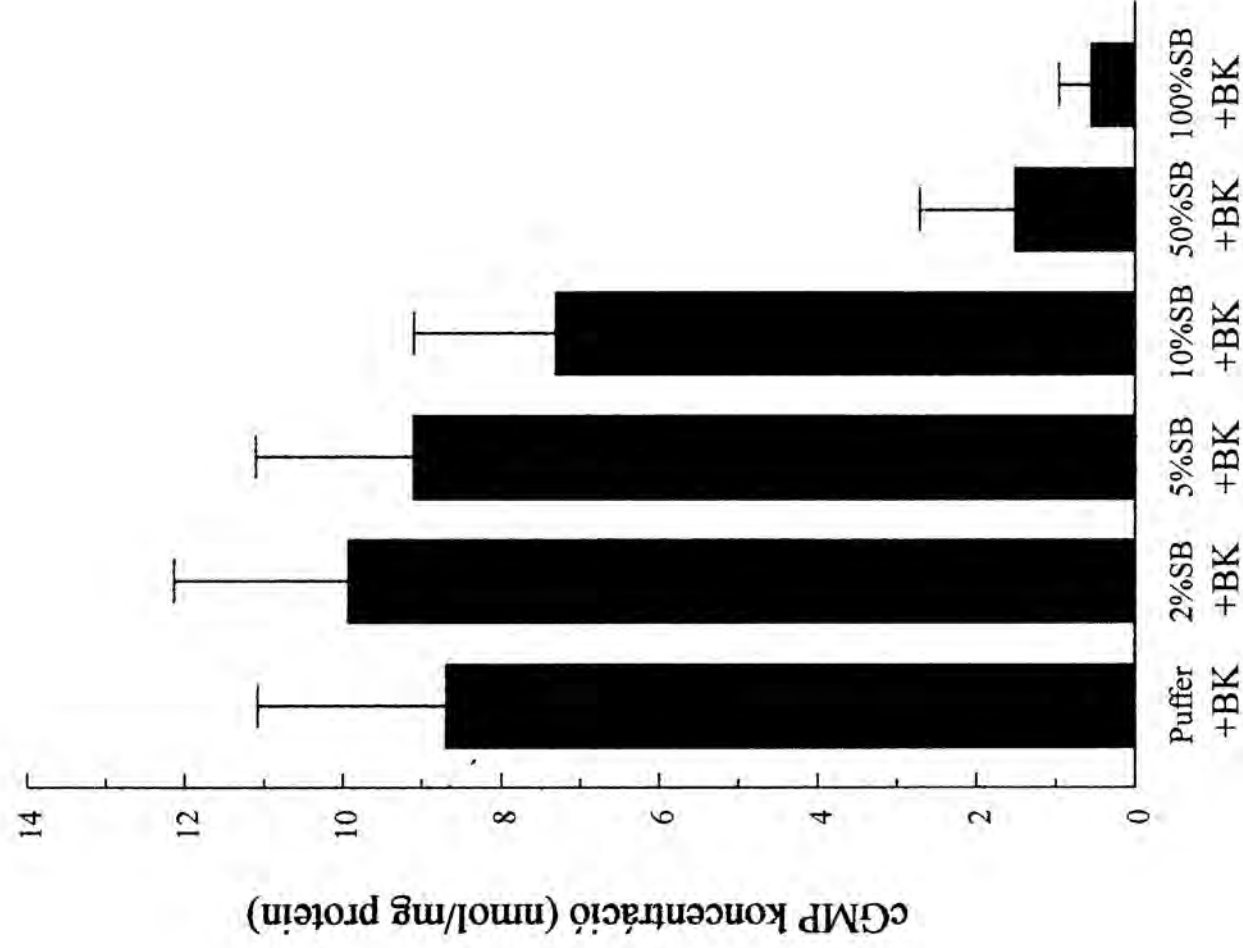
Az SB ezen hatását nem tudta kivédeni a szuperoxid dizmutáz, a kataláz és a dezferrioxamin sem (ábrán nem mutatott eredmények). Hatékony scavangernek bizonyult viszont a redukált glutation, amely koncentráció függően gátolta az SB hatását, 50  $\mu$ mol/l GSH már szignifikánsan csökkentette az SB toxicitását, és 2 mmol/l komplett prevenciót eredményezett (14. ábra).

Mindezek alapján az SB cGMP termelést csökkentő hatásaért nem tehető felelőssé modellünkben a szuperoxid-, a hidroxil szabad gyök, a hidrogén peroxid és a lipid

peroxidáció. Felmerül azonban annak a lehetősége hogy az SB-ben nagy koncentrációban jelenlévő nitrogén valamely oxidált származéka és a tiol csoportot elfogyasztó valamely égési aldehid termék okozná az enzim károsodást. Ennek igazolására Nash módszere szerint meghatároztuk az SB formaldehid tartalmát. Vizsgálatainkkal  $0,73 \pm 0,16$  (átlag $\pm$ SD)  $\mu\text{mol}$  formaldehid termelést mértünk 1 cigaretta elégeése során. Az Ellman reagenst használva, amely az íntakt tiol csoportot mutatja ki, megállapítottuk, hogy a formaldehid koncentrációfüggően elfogyaszja a redukált glutation tiol csoportját (15. ábra).

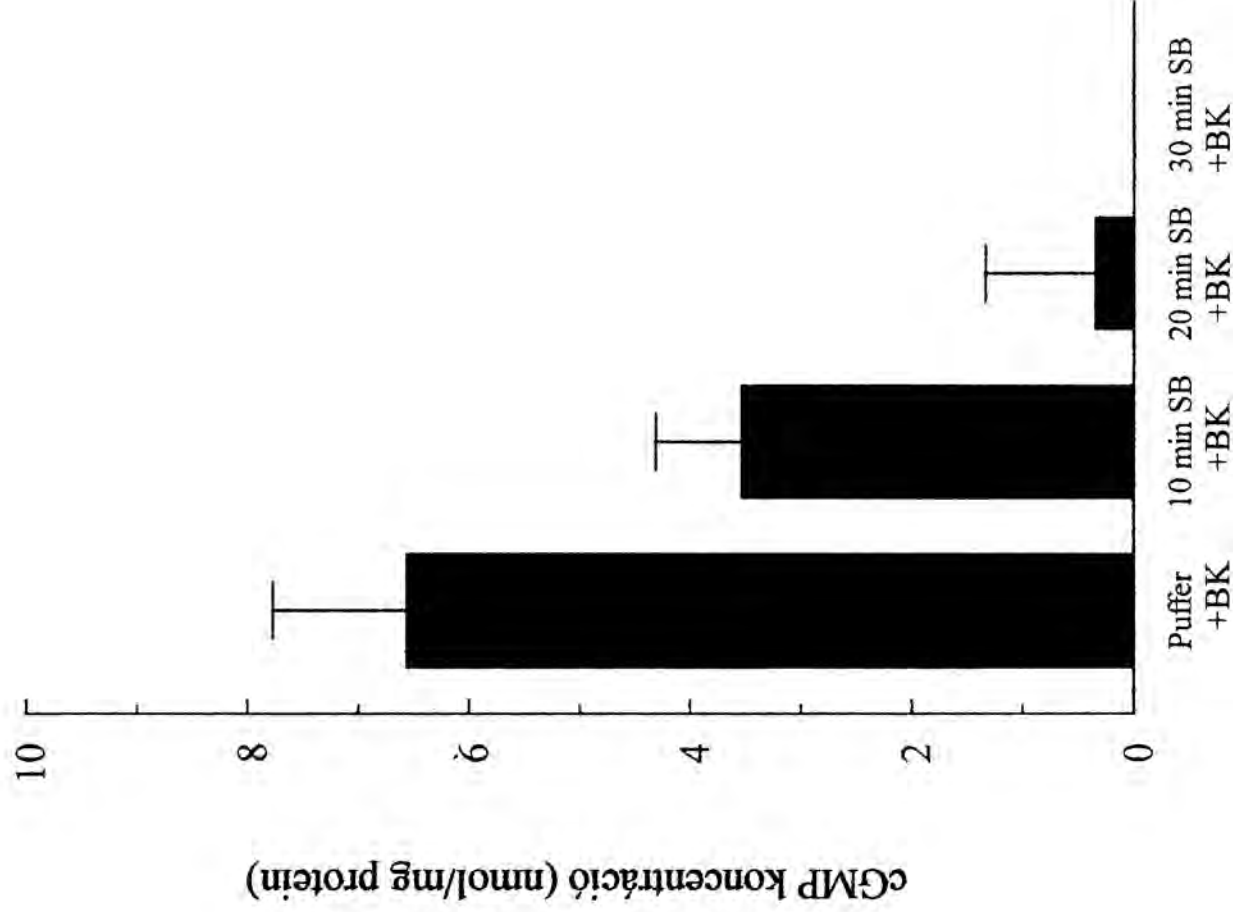
### 5.2.1.3. Összefoglalás

A dohányfüst hatására az endothélséjtek cGMP termelése csökken, a károsodás GSH segítségével kivédhető. A jelenség szabadgyökös háttéréről annyi megállapítható, hogy a cGMP szint csökkenését valószínűleg a nitrogén oxidált termékei és a dohányfüst formaldehid tartalmának SH-csoport csökkentő additív hatása hozza létre.

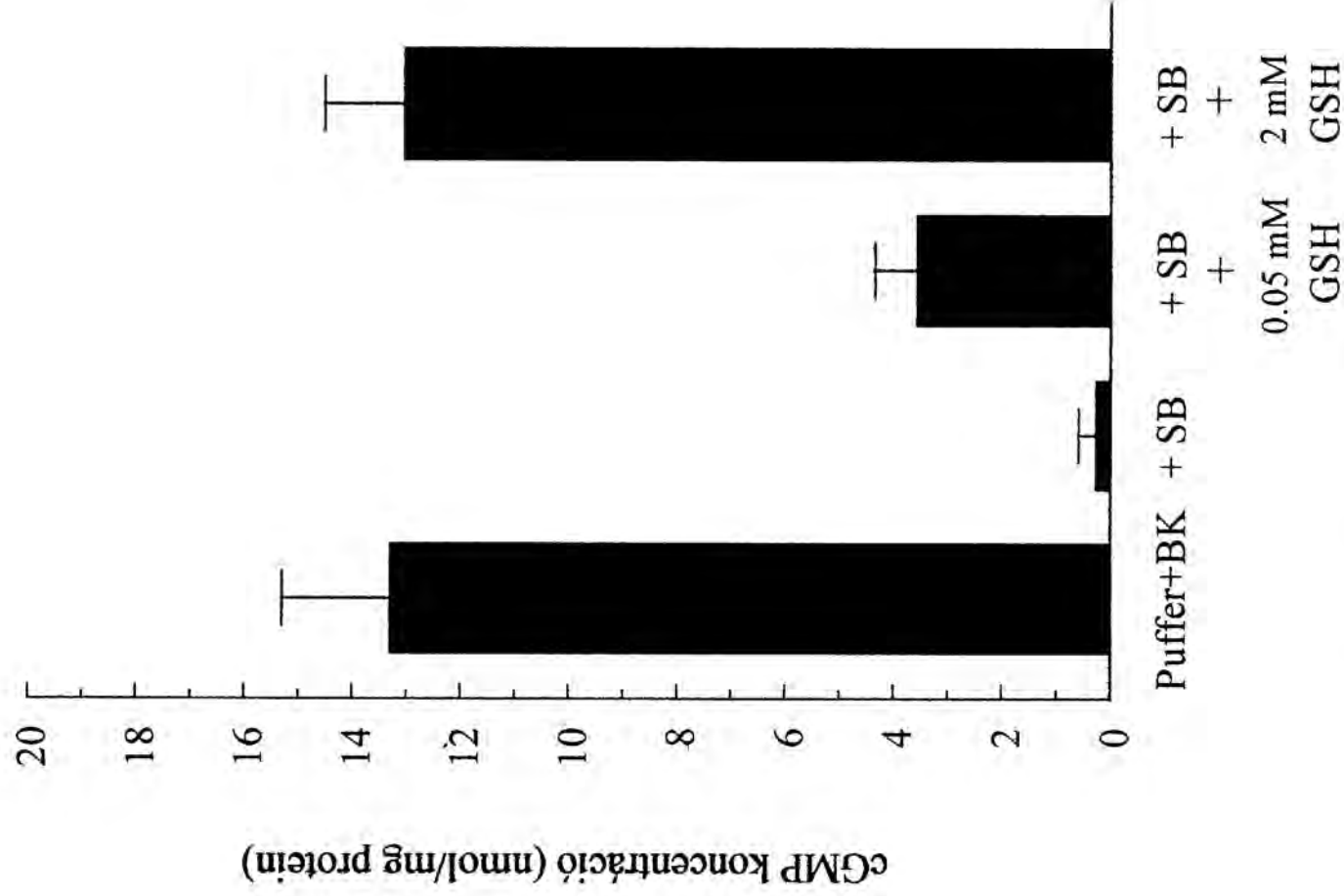


12. Ábra. Endothelsejtek cGMP termelésének csökkenése a dohányfüst-puffer (SB) koncentrációjának függvényében (n = 6).  $p < 0,04$  (50 %-os SB+BK vs BK),  $p < 0,008$  (100 %-os SB + BK vs BK).

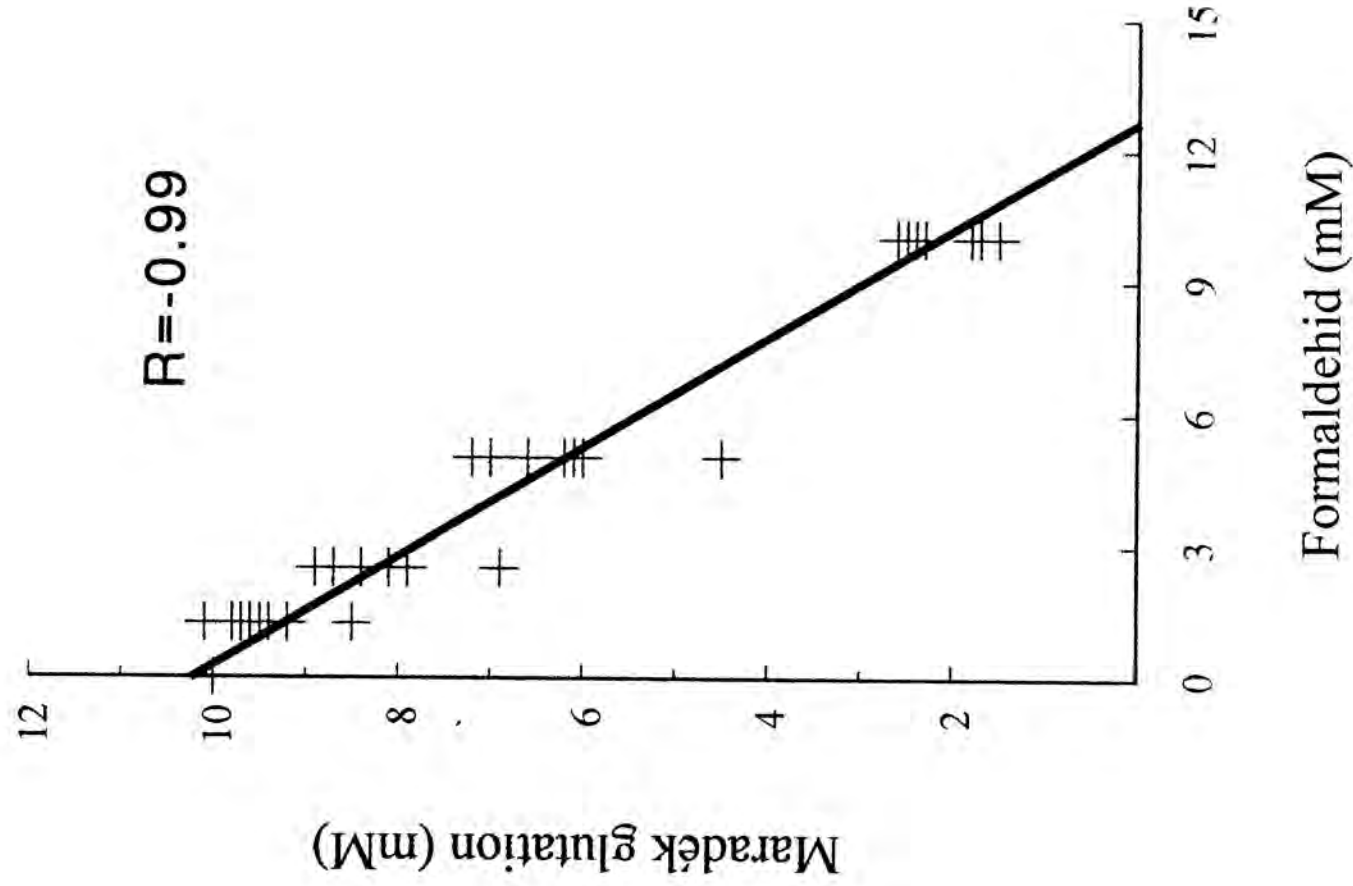




13. Ábra. Endothelsejtek cGMP termelésének csökkenése 50 %-os dohányfüst-pufferrel (SB) történő 10, 20 és 30 perces inkubáció során (n = 6).  $p < 0,006$  (puffer+BK vs. 10 min SB + BK),  $p < 0,0002$  (puffer+BK vs. 20 min SB + BK),  $p < 0,0001$  (puffer+BK vs. 30 min SB + BK).



14. Ábra. A redukált glutation (GSH) kivédi a dohányfüst-puffer (SB) cGMP termelést csökkentő hatását (n = 6).  $p < 0,0001$  (SB + BK vs. SB + BK + 0,05 mM GSH),  $p < 0,0001$  (SB + BK vs. SB + BK + 2 mM GSH).



15. Ábra. A formaldehid koncentráció-függően csökkenti a redukált glutation koncentrációját ( $n=8$ ,  $r = -0,99$ ).

### 5.2.2. A dohányfüst fehérje degenerációt okozó hatásának mérése natív PAGE módszerrel (thesis X)

A dohányfüst fehérje degenerációt (szabad gyök-kiváltotta degradáció, és interbridging, azaz nagymolekulásúlyü termékek képződése) okozó hatásának kimutatására (amely minden valószínűség szerint érinti az NO-cGMP rendszert is) natív polyacrilamid gélelektroforézist (PAGE) használtunk.

#### 5.2.2.1. Módszerek

A 5.2.1.1. pont alatt leírt módon dohányfüst puffert (SB) készítettünk. Ezzel a pufferral kezeltük a mosott thrombocyta szuszpenziókat. A vért 5,8 mM EDTA-t tartalmazó pH 7,4-es glukóz-foszfát pufferrel kétszeresére hígítottuk. Azonnali elegyítést követően a mintát 200 g-vel 10 percig, szobahőmérsékleten (24 °C-on), kilendülő fejes rotorral centrifugáltuk. A thrombocytaikat tartalmazó felüliszót leszívtuk, majd ismét kétszeresére hígítottuk 5,8 mM EDTA-t tartalmazó glukóz-foszfát pufferrel. Ezt követően 2000 x g-n, szobahőmérsékleten 10 percig üleptítettük. A centrifugacső alján található vérlemezekről a felüliszót egy határozott mozdulattal leöntöttük. A felüliszó leöntését követően a vérlemezeket a sejtszámtól függő mennyiségű, pH 7,4-es foszfát pufferbe vettük fel.

A thrombocyta szeparálás során alkalmazott oldatok összetétele a következő volt: A foszfát puffer készítésekor 7,1 g NaCl-ot oldtunk 1000 ml desztillált vízben, majd folyamatos keverés közben adtunk a sóoldathoz még 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -ot, 0,2 g KCl-ot, és 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ot. A glukóz tartalmú foszfát puffer oldat összeállítása esetén 1000 ml foszfát pufferhez 1,0 g d-glükózt kevertünk. A 10 %-os EDTA oldatot úgy állítottunk elő, hogy 150 ml desztillált vízben, folyamatos keverés és melegítés közben, 15 g Selecton B-t oldottunk. Az 5,8 mM EDTA-t tartalmazó glukóz-foszfát puffer összeállításánál 2,26 ml 10 %-os EDTA-t adtunk 47,74 ml glukóz-foszfát puffer oldathoz.

Az SB-vel végzett kezelés után 10000 x g-n végzett centrifugálással a vérlemezkéket leüleptítettük, majd Triton X-100-al kezeltük, mert a membránhoz kötött eNOS solubilizációjához detergensre van szükség (86). Az így nyert homogén oldat protein tartalmát Lowry metodikája szerint határoztuk meg (84). Hígítással a minták protein tartalmát azonosra állítottuk be. Így az elektroforézis során minden helyre ugyanannyi fehérjét töltöttünk be. Az SDS PAGE módszerrel nem tudunk kimutatni fehérjeszerkezetbeli eltérést SB jelenlétében, ezért natív PAGE vizsgálatot is végeztünk, melyhez 12,5-ös minigélt használtunk (Pharmacia, PhastSystem). A futtatás után ezüstözést végeztünk. A fehérje frakciók molekulásúlyának becslésére natív molekulásúly standardot használtunk (Sigma Chemical Co). A kapott géleket denzitometriás vizsgálattal analizáltuk. A vizsgálatokat a továbbiakban endothelsejt kultúrán is megisméltük különböző szabad gyök scavangerek jelenlétében is. Az endothel sejteket a 5.2.1.1. pont alatt leírt módon tenyésztettük. A konfluáló tenyészetet SB-vel és esetenként antioxidánsokkal inkubáltuk. Ezután Triton X-100-al kezeltük a tenyészetet, és az így nyert folyadék fehérje tartalmát analizáltuk a natív PAGE módszerrel, az előzőekkel mindenben megegyező módon.

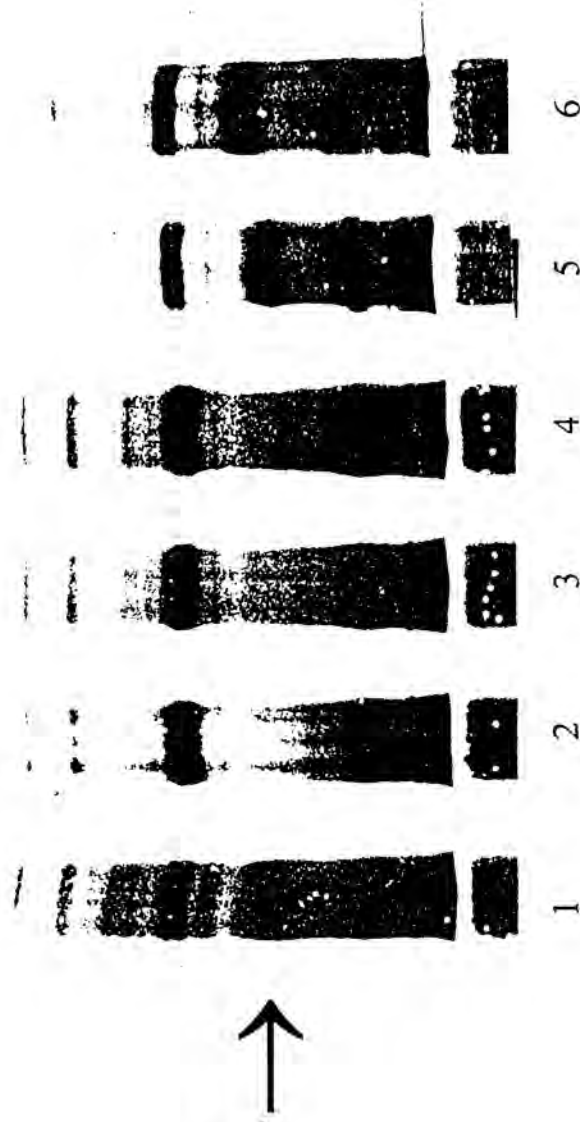
#### 5.2.2.2. *Eredmények*

A Triton X-100-al kezelt thrombocytákban egy 270 kD molekulásúlyú fehérjének (a natív, constitutív, endothelialis NOS enzim molekula súlya 270 kD) a denzitáscsökkenését tapasztaltuk. A fehérje az SB növekvő koncentrációi mellett végül teljesen eltűnt (16. ábra). Nagymolekulásúlyú aggregátumok, vagy kismolekulásúlyú degradátumok nem voltak detektálhatók a 12,5-es gél felhasználásával. Az endothelsejt fehérjék vizsgálatakor egy 270 kD molekulásúlyú fehérje eltűnését észleltük SB hatására, amit a redukált glutation (5 mmol/l) teljes mértékben kivédett. Az oxidált glutation (GSSG, 5 mmol/l) tovább fokozta a fehérje eltűnését (17. ábra). Kataláz (1000 E/l), szuperoxid dizmutáz (100 E/l), és a lipid

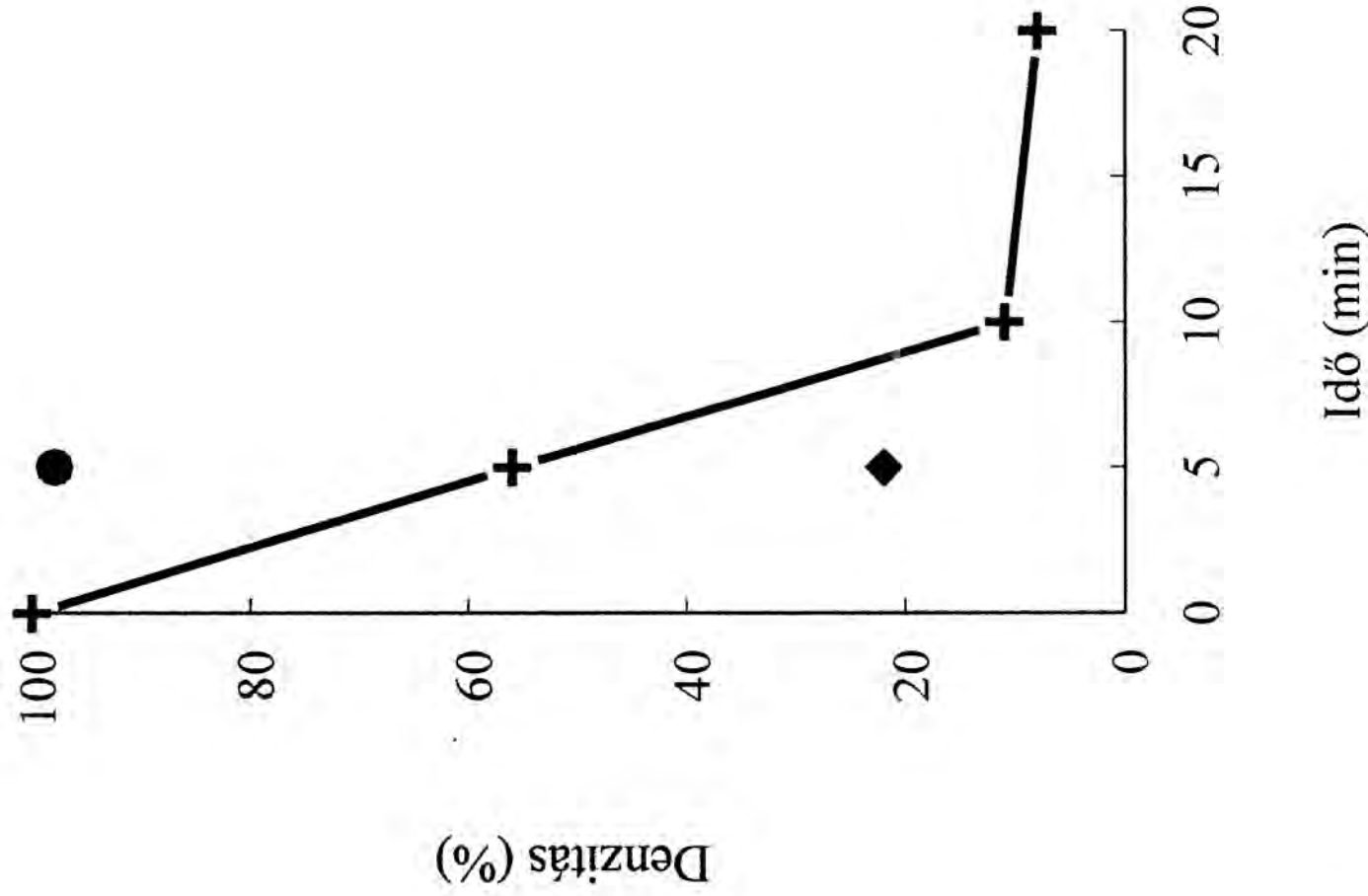
peroxidáció gátlók (Trolox 0,1 mmol/l, BHT 0,1 mmol/l) nem fejtettek ki védő hatást (ábrán nem mutatott eredmények).

### 5.2.2.3. Összefoglalás

A dohányfüst hatására a thrombocytákban és az endothelsejtekben egy 270 kD molekulású fehérje károsodása mutatható ki, amely fehérje (molekulásúlya alapján) a NOS enzim is lehet. Az SB okozta károsodás, hasonlóan a cGMP mérések során tapasztaltakhoz, GSH-val kivédhető volt.



16. Ábra. Dohányfüst-pufferrel kezelt thrombocyták fehérjéinek natív poliakrialamid gél elektroforézis (natív PAGE) vizsgálata. 1. csík = kontroll, 2. csík = 2x-re hígított dohányfüst (SB), 3. csík = 2,5x hígítás, 4. csík = 3x hígítás, 5. csík = 7x hígítás, 6. csík = 28x hígítás. A mosott thrombocytákat 30 percig inkubáltuk a jelzett hígítású pufferekkel. A nyíl a 270 kD molekulású fehérje csík helyét jelöli.



17. Ábra. Endothelsejtek dohányfüst-pufferrel történő 5, 10, 20 perces inkubációja fehérje-csík (250-300 kD) eltűnését vált ki a sejtek Triton-X-100-as extractumában (+). ● = dohányfüst-puffer + 5 mmol/l GSH, ◆ = dohányfüst-puffer + 5 mmol/l GSSG.



### 5.2.3. *Hypoxia modell (thesis XI, XII, XIII)*

Hypoxiával és pseudohypoxiával diabetes mellitusban egyaránt számolnunk kell. A két jelenség subcelluláris mechanizmusában nagyon hasonló. Míg a hypoxiában az oxigén hiánya miatt, addig a pseudohypoxiában (pl. diabetes mellitusban, alkoholos májkárosodásban) a fokozott substrát kínálat (glukóz, alkohol) miatt szaporodik fel pathológias módon a NADH mennyisége a sejtekben. Feltételeztük, hogy a magas NADH koncentráció szabad gyökök termelését indítja meg az oxidáz enzimek révén. Ezért modellünkben a szabadgyökös károsításokra érzékeny glukóz-6-foszfataz (G6Páz) enzim működését vizsgáltuk úgy, hogy a (pseudo)hypoxiát a NADH magas dózisainak használatával modelleztük.

#### 5.2.3.1. *Módszerek*

A vizsgálatok során használt végkoncentrációk az alábbiak voltak: glukóz-6-foszfát (a G6Páz enzim szubsztátja, amiből az anorganikus foszfát felszabadul az enzim működés hatására, és amit végülis mérünk): 10 mmol/l, kataláz: 2600 U/ml, SOD: 49 U/l, dezferrioxamin: 2 mmol/l, NADH: 1.4 mmol/l, DMSO: 50 mmol/l, etanol: 100 mmol/l, GSH: 2 mmol/l, BHT: 0.1 mmol/l, Trolox: 0.1 mmol/l.

Máj mikroszóma frakciót izoláltunk 200-250 g testtömegű, hím Sprague-Dawley patkányokból. A májat először 0.9 %-os NaCl-al perfundáltuk, hogy a szerv vértartalmát eltávolítsuk. Ezt követően a májat gyorsan eltávolítottuk, rutin módon homogenizáltuk 0.25 mol/l szukrózi, 0.01 mol/l Tris-HCl-t (pH 7.4), 0.001 mol/l EDTA-t és 50 μmol/l desferrioxamin tartalmazó oldatban. A mikroszóma frakciót differenciál centrifugálással izoláltuk 100.000 x g-vel, kétszer mostuk 0,125 mol/l KCl-al, végül resuspendáltuk 0.125 mol/l KCl-ban és -75 °C-on tároltuk.

A vas komplexek preparálása úgy történt, hogy ferri ammónium szulfátot 0.1 mol/l HCl-ban oldottunk, és utána a megfelelő keláló anyaggal hígítottuk. A ferri-ATP komplexet 1:20 arányban, a ferri-EDTA komplexet 1:2 vas:komplex-képző arányban állítottuk elő.

A mikroszóma frakciót 50 mmol/l-es Tris-HCl (pH 7.4) pufferben, 10 mmol/l glukóz-6-foszfáttal, 1.4 mmol/l NADH jelenlétében vagy hiányában, 100  $\mu$ mol/l vas komplex-szel és scavanger-ekkel 10-60 percig inkubáltuk 37 °C-on. A reakciót 0.5 ml triklórecetsavval állítottuk le (10 %-os végkoncentráció). A mintákat 4 °C-on 14 percig centrifugáltuk. A felülúszó 1 ml-éből anorganikus foszfátot határoztunk meg a LeBel és mtsai által leírt módszer szerint (87). A fehérjét Lowry metodikájának megfelelően határoztuk meg (84). Minden kísérletet háromszor ismételtünk meg, duplikátumokat alkalmazva. Az átlagot és az SD-t számoltuk ki. Az ANOVA tesztet alkalmaztuk a szignifikancia vizsgálatára.

#### 5.2.3.2. Eredmények

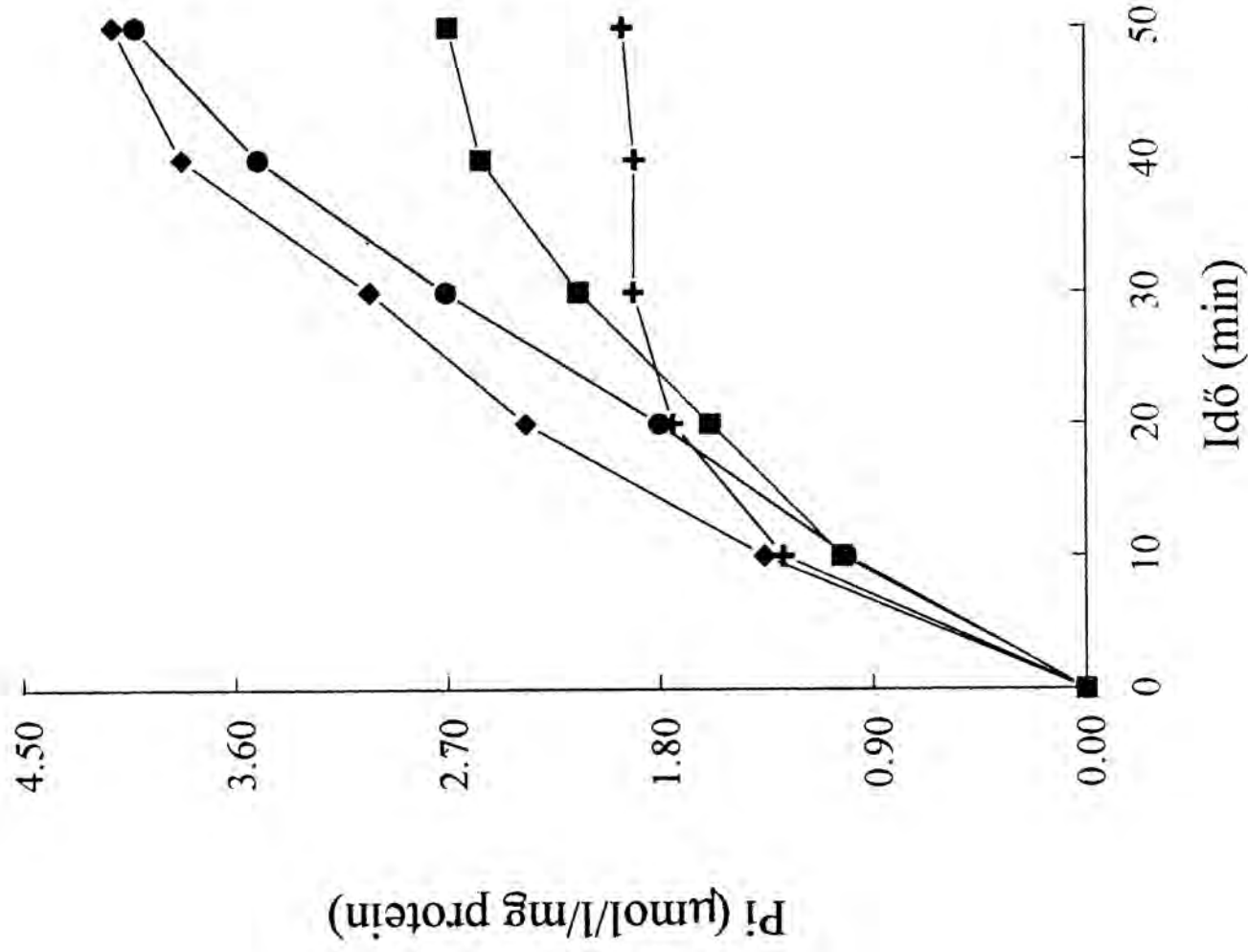
A G6Páz enzim aktivitása csökken NADH jelenlétében (18. ábra). Ha Fe-ATP komplexet is adunk az inkubáló médiumhoz, akkor a NADH okozta gátlás még kifejezettebb volt. Az enzim-gátlás szabadgyökös háttérét scavangerek adagolásával tanulmányoztuk (19. ábra). A NADH-kiváltotta G6Páz enzim-gátlás kivédhető volt a vaskomplexáló dezferrioxaminnal, a lipid peroxidáció gátló Trolox-al és a nem-specifikus scavanger GSH-val. Hatástalan volt a SOD, a kataláz és a dimetil szulfoxid.

Ha Fe-EDTA jelenlétében valamint NADH jelenlétében és hiányában vizsgáltuk a G6Páz enzim aktivitás változását, akkor az előzőekhez részben hasonló, részben különböző eredményeket kaptunk. A Fe-EDTA komplexről ismert, hogy megakadályozza a lipid peroxidációt, de lehetővé teszi a hidroxil szabad gyök képződését. Fe-EDTA alkalmazása során szintén csökkent a G6Páz enzim aktivitása NADH jelenlétében (20. ábra). Ezt a gátlást a

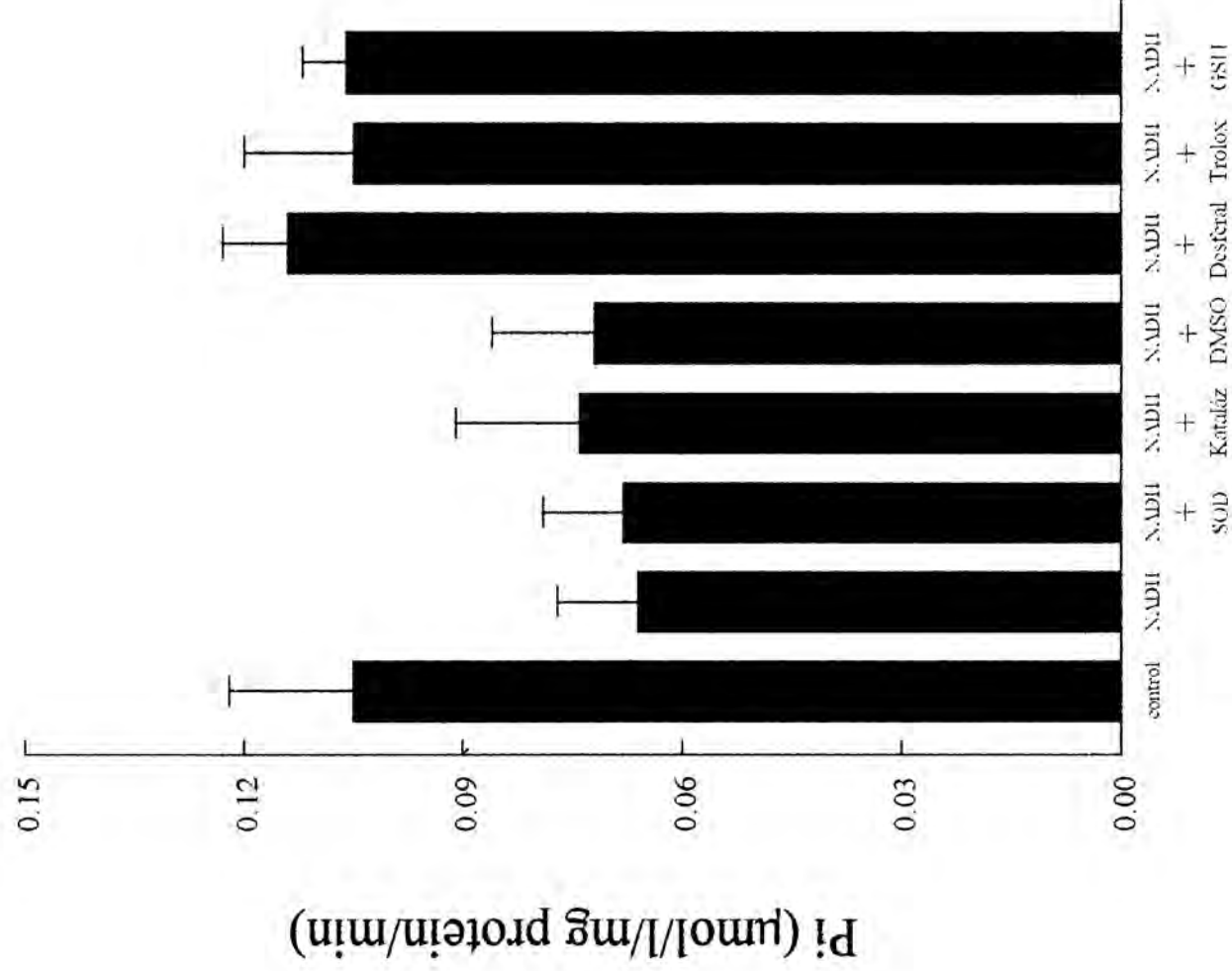
Fe-EDTA rendszerben a BHT, Trolox nem befolyásolta, de a kataláz, az etanol és a GSH kivédte (21. ábra).

### 5.2.3.3. Összefoglalás

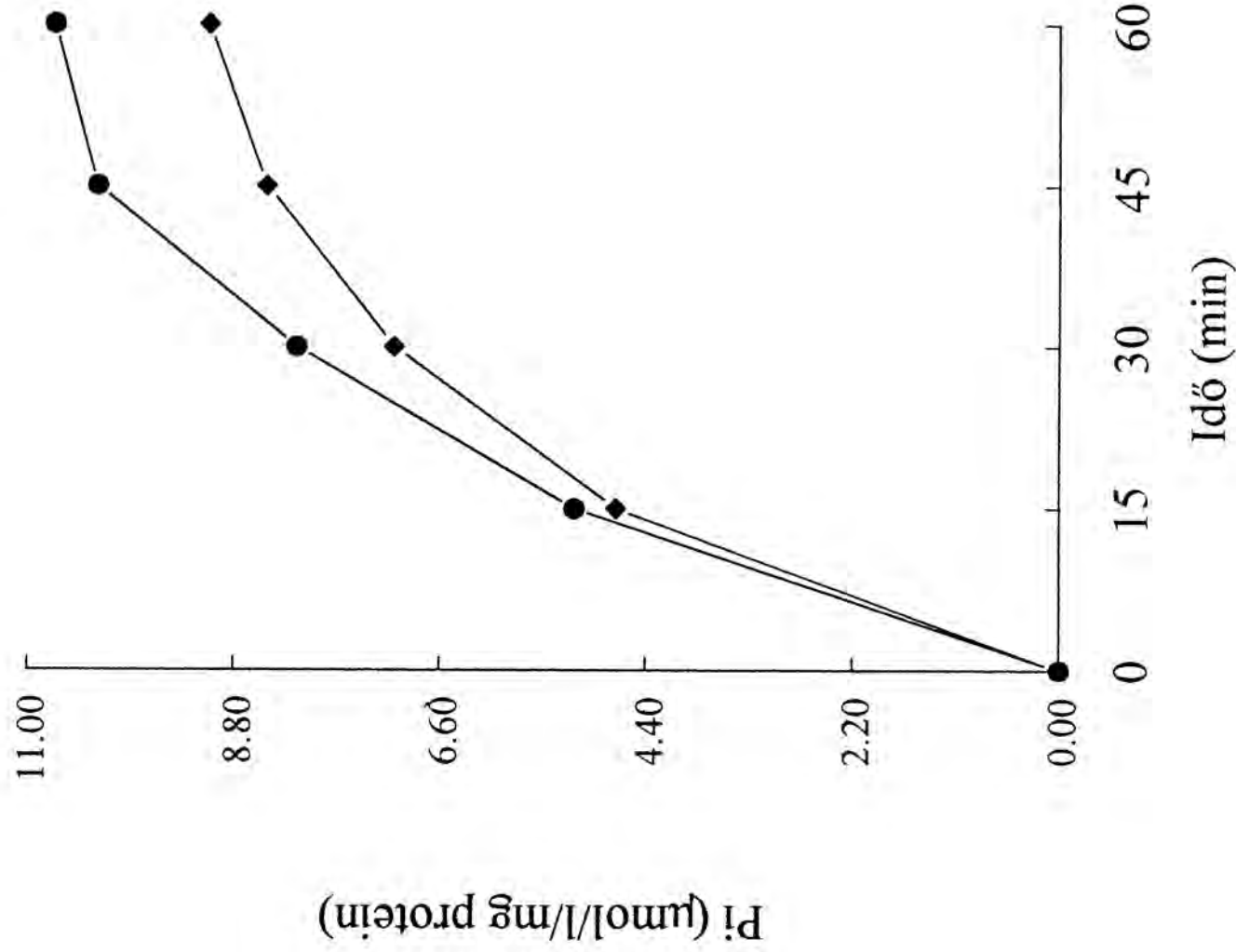
A hypoxia és/vagy pseudohypoxia során a jelenlévő vas komplex milyensége határozza meg, hogy elsősorban lipid peroxidáció, vagy hydroxil szabad gyök képződés okozza a szöveti károsodást. A hidroxil szabad gyök a szuperoxidból képződik a már említett Fenton reakció során (lásd 3.4.1. és 5.1.3.1., 5.1.3.2). Az oxidatív stress során termelődő szuperoxid szabad gyök inaktiválja az NO-t, peroxinitritet képez, megakadályozva ezáltal, hogy az NO kifejtse a guanilát cikláz aktiváló hatását, mely végül a cGMP termelődés csökkenéséhez vezet. cGMP hiányában azok a protein-foszforilációk sem alakulnak ki, amelyek az NO-cGMP rendszer működését jellemzik.



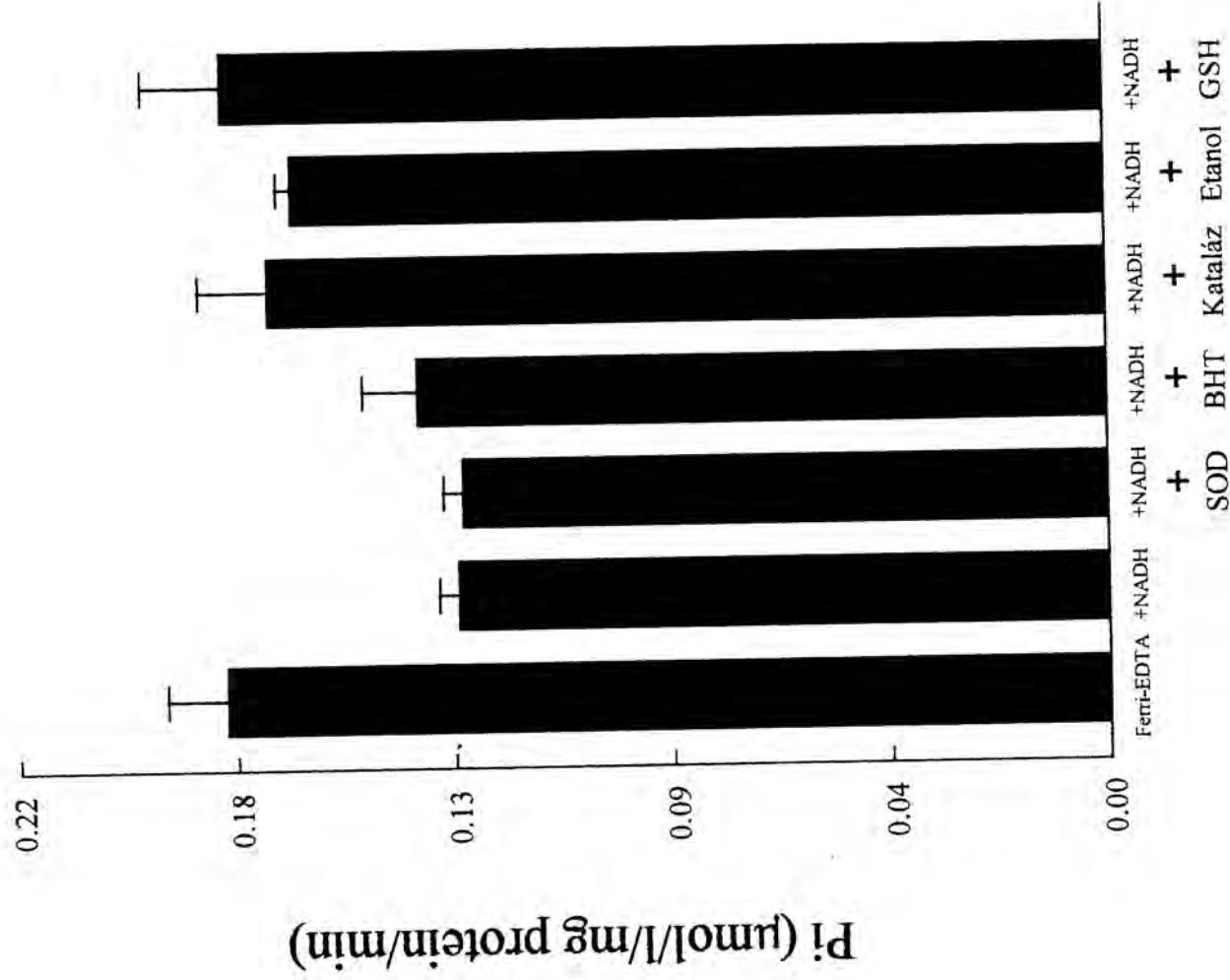
18. Ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzim gátlása NADH-val ferri-ATP jelenlétében és hiányában. Pi = a glukóz-6-foszfát hidrolízise során az enzim által termelt anorganikus foszfát, ● = kontroll, ◆ = kontroll + ferri-ATP, ■ = kontroll + NADH, ✚ = ferri-ATP + NADH.  $p < 0,03$  (30. min),  $p < 0,02$  (40 min),  $p < 0,01$  (50 min), kontroll vs. NADH, és  $p < 0,01$  (30, 40, 50 min) ferri-ATP vs. ferri-ATP + NADH.



19. Ábra. Scavangerek hatása a NADH által kiváltott glukóz-6-foszfátáz enzim-gátlásra.  $P_i = a$  glukóz-6-foszfát hidrolízise során az enzim által termelt anorganikus foszfát, SOD = szuperoxid dízmutáz, DMSO = dimetil szulfoxid, Desferal = dezferrioxamin, GSH = redukált glutation.  $p < 0,01$  (kontroll vs. NADH és NADH vs NADH + Desferal, NADH + Trolox, NADH + GSH),  $p > 0,05$  (NADH vs. NADH + SOD, NADH + Kataláz, NADH + DMSO).



20. Ábra. A NADH gátló hatást fejt ki a glukóz-6-foszfataz enzimre ferri-EDTA jelenlétében, TRIS-HCl puffer hiányában. Pi = a glukóz-6-foszfát hidrolízise során az enzim által termelt anorganikus foszfát, ● = ferri-EDTA, ◆ = NADH + ferri-EDTA.  $p < 0,01$  (ferri-EDTA vs NADH + ferri-EDTA a 45. és 60. percben).



21. Ábra. Scavangerek hatása a NADH + ferri-EDTA glukóz-6-foszfátáz enzim-gátlására. SOD = szuperoxid dizmutáz, BHT = butilált hidroxitoluén, GSH = redukált glutation.  $p < 0,01$  (ferri-EDTA vs. ferri-EDTA + NADH és ferri-EDTA + NADH + SOD vs. ferri-EDTA + NADH +kataláz, ferri-EDTA + NADH + etanol, ferri-EDTA + NADH + GSH),  $p > 0,05$  (ferri-EDTA + NADH vs. ferri-EDTA + NADH + SOD, ferri-EDTA + NADH +BHT).

#### 5.2.4. Nem-enzimatis glikációs modell

Jelen tudásunk szerint, a nem-enzimatis glikáció az egyik legfontosabb pathophysiologiai tényező a diabetes mellitus szövődményeinek kialakulásában. Több alkalommal is felvetették ennek esetleges szabadgyökös jellegét, pontos mechanizmusát azonban mind a mai napig nem tisztázták. Ha ezen szabad-gyökös folyamatokban szuperoxid gyök is termelődhet, akkor az előző pontban elmondottak alapján a nem-enzimatis glikációnak is szerepe lehet az NO inaktiválásában.

Vizsgálatainkban ESR és spin trap ESR vizsgálatokat alkalmaztunk a glukóz és az arginin egymáshatásából termelődött szabad gyökök kimutatására. Az arginin nem egy a sok aminosav közül, ami glikálódhat, hanem a NOS enzim szubsztrátja, ezért alapvető fontosságú lehet az arginin nem-enzimatis glikációból eredő modifikálódása. A spin trap módszer lényege az, hogy azokat a szabad gyököket, amelyeknek túl rövid az élettartamuk és ezért egy adott pillanatban túl kis koncentrációban vannak jelen (így direkt ESR vizsgálattal nem mutathatók ki) a csapdázó anyagok megkötik, stabilizálják. Így hosszabb idő alatt olyan mértékben felgyülemlik a gyök+gyökcsapda stabil szabad gyöke, hogy ezt már detektálni lehet az ESR készülékkel. Ez a módszer alkalmas pl. a rövid élettartamú oxigén szabad gyökök kimutatására (szuperoxid, hidroxil szabad gyök stb.).

#### 5.2.4.1. Arginin-glukóz reakció magas hőfokon (thesis XIV, XV, XVI, XVII, XVIII)

A kémiai reakciók magasabb hőmérsékleten gyorsabban mennek végbe, ezért feltételezhető volt, hogy a termelődő szabad gyökök mennyisége is nagyobb ilyenkor.

#### 5.2.4.1.1. Módszerek

Először 90 °C körüli hőmérsékleten kíséreltünk meg kimutatni szabad gyök jelet. Foszfát-pufferelt sóoldatot (PBS) alkalmaztunk, pH 7,5 és 8 között. A detektálhatóság javítása



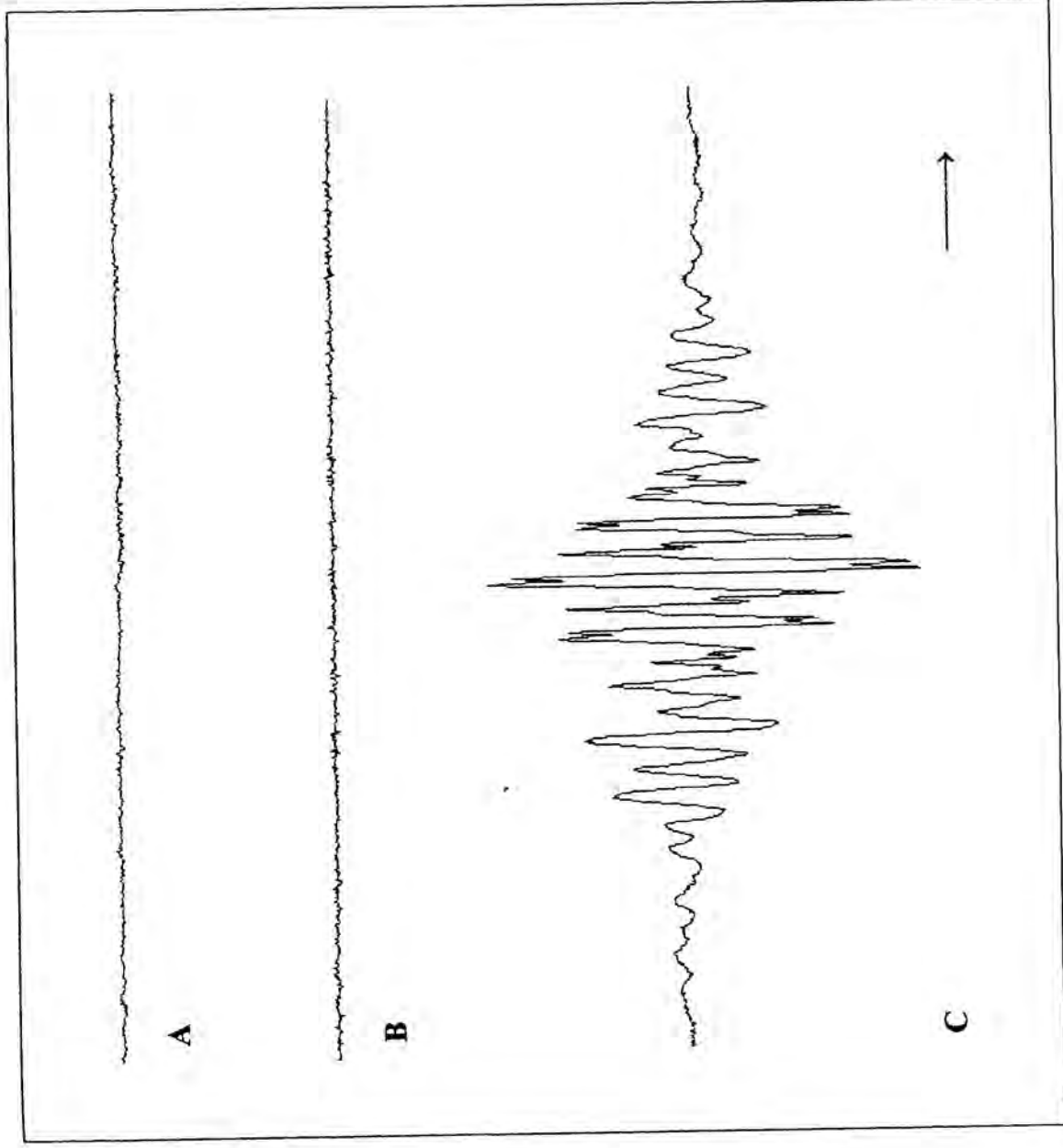
érdekében magas koncentrációkat alkalmaztunk: 1 mol/l glukózt, 1 mol/l arginint. A gyök termelést katalizátorral, vassal segítettük elő. A vas oldása a 5.2.3.1. pont alatt leírtaknak megfelelően történt. A méréseket Bruker ESP 300 E jelű ESR készüléken végeztük. Az ESR készülék beállítása az alábbi volt: mikrohullámú teljesítmény 20 mW, modulációs amplitúdó: 0,2 G, sweep szélesség 50 G.

#### 5.2.4.1.2. Eredmények

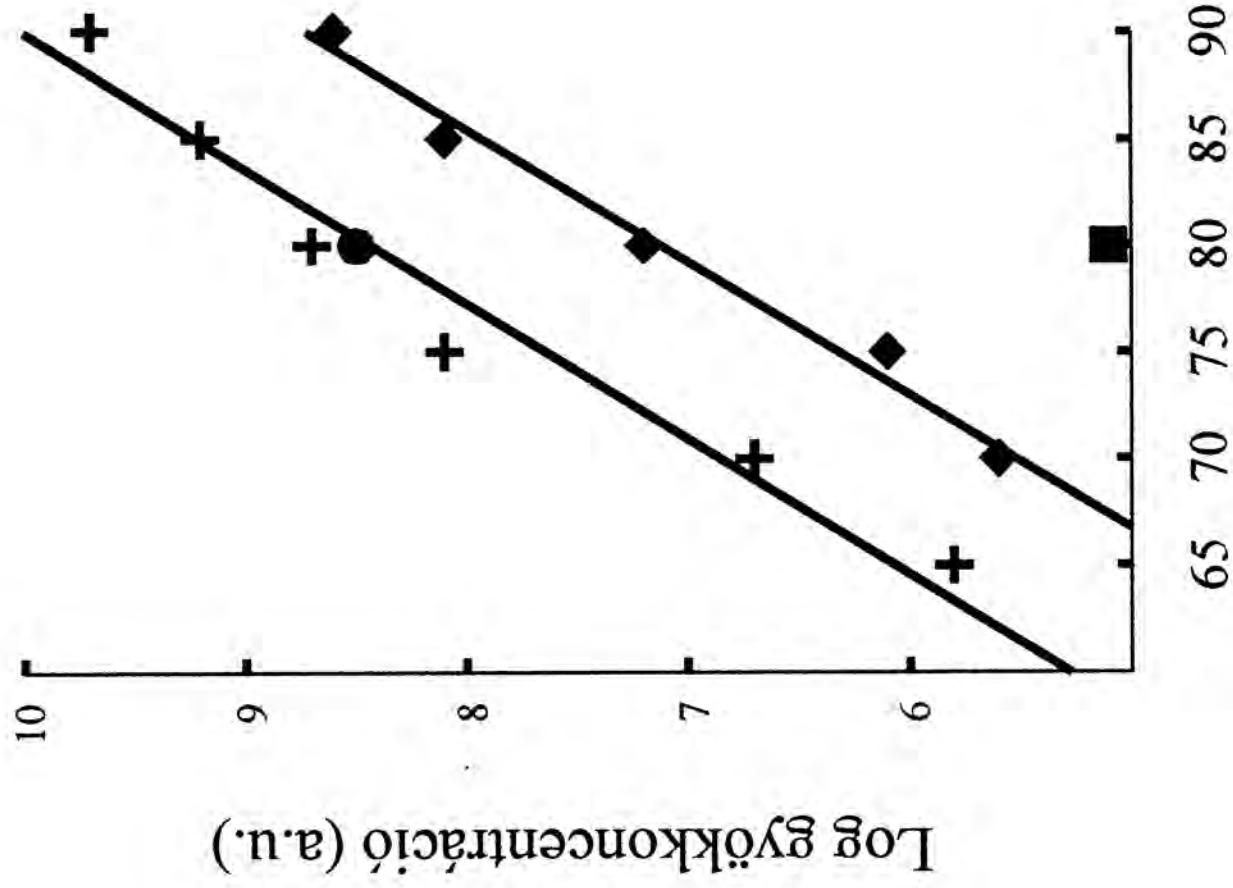
90 °C-on az arginin vagy a glukóz önmagában nem, de a kettő együtt ESR jelet adott, ami a görbe analízis szerint, a kölcsönható atomok figyelembevételével, pirazil vagy pirimidinil gyöknek felelt meg (22. ábra). A gyök keletkezésében a vas katalitikus szerepet játszik, mert a ferro és a ferri vas is növelte a gyök képződés sebességét, ugyanis 65 °C-on vas nélkül már nem tudtunk ESR jelet detektálni, vas jelenlétében azonban a 22. ábrán látott ESR szignált kaptuk (23. ábra). Ha a ferri vasat stabilizáltuk a komplexképző desferrioxamminal, a gyök jel eltűnt, ami arra utal, hogy a reakció lejátszódásához ferri-ferro átalakulás szükséges (23. ábra). A gyök produkciójának hőmérséklet és katalizátor függését 65 és 90 °C között igazoltuk (23. ábra). A detektált gyök koncentrációból extrapolálva kimutatható, hogy az ESR metódika elméleti érzékenységének határai miatt testhőmérsékleten a reakciót ezzel a módszerrel igazolni nem tudjuk (24. ábra).

#### 5.2.4.1.3. Összefoglalás

A NOS szubsztrátja, az arginin glukóz jelenlétében glikálódik, a reakciót vas katalizálja, ferri-ferro átalakulás szükséges hozzá, eredményeképpen pirazil vagy pirimidinil szabad gyök keletkezik. A reakció hőmérséklet függő és az ESR érzéketlensége miatt testhőmérsékleten nem detektálható.

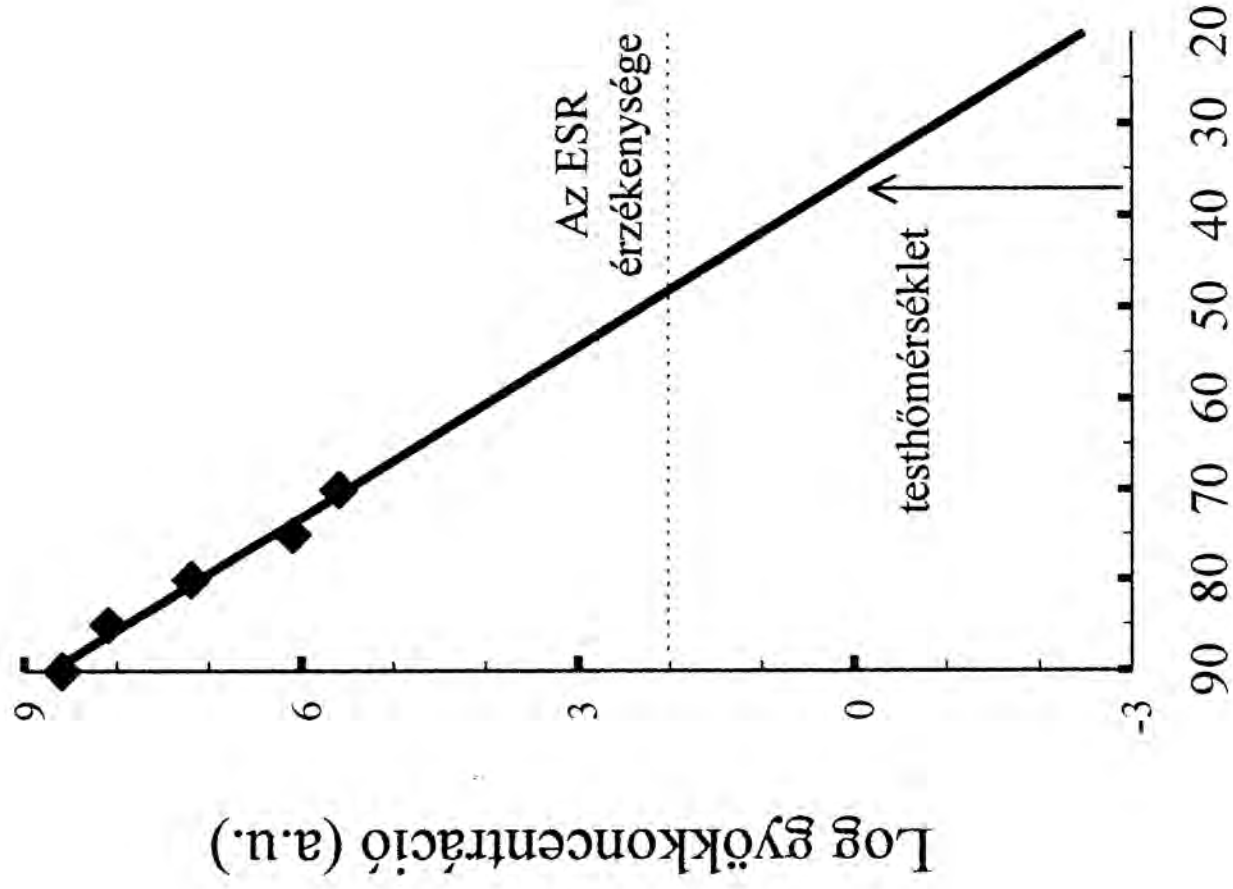


22. Ábra. Az arginin glikációja glukózzal 90 °C-on. A = 1000 mmol/l glukóz, B = 1000 mmol/l arginin, C = 1000 mmol/l glukóz + 1000 mmol/l arginin. A nyíl a térerő irányát és nagyságát jelöli (5 mT).



## Hőmérséklet (°C)

23. Ábra. A vas katalizáló hatása a glukóz-arginin reakcióra 65-90 °C között. ◆ = vas hiányában, + = ferro vas jelenlétében (1 mmol/l), ● = ferri vas jelenlétében (1 mmol/l) 80 °C-on, ■ = ferri vas (1 mmol/l) + dezferrioxamin (10 mmol/l) jelenlétében 80 °C-on.



## Hőmérséklet (°C)

24. Ábra. Extrapoláció alapján számított gyök koncentrációk az ESR módszer érzékenységének és a testhőmérsékletnek a feltűntetésével.

#### 5.2.4.2. Glukóz- és arginin-kiváltotta ferri-redukció (thesis XIX)

Vizsgálatainkkal tisztázni kívántuk, hogy az arginin + glukóz reakcióban szereplő elektron termelésére melyik molekula képes. Mivel úgy tűnt, hogy a reakcióban alapvető fontosságú a vas szerepe, ezért a ferri vas redukcióját mértük. A redukált ferri vas, a ferri forma, képes az oxigénnel reagálni és szuperoxid szabad gyököt termelni.

##### 5.2.4.2.1. *Módszerek*

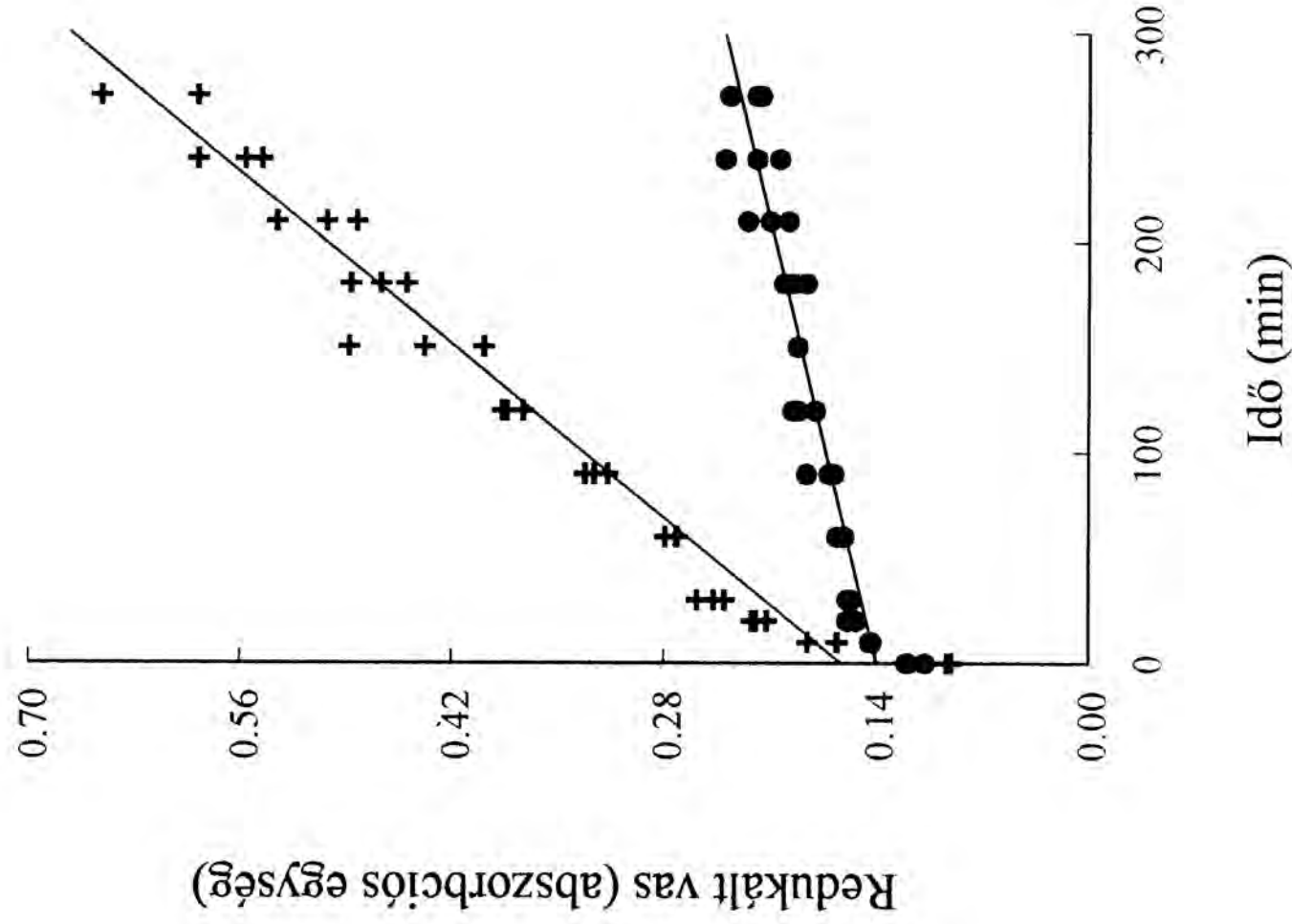
A ferri vas redukcióját ferrozin segítségével, szobahőmérsékleten, fotometriásan 561 nm-nél mértük. A ferrozin csak a redukált ferro vassal képes komplexet alkotni, és ezen komplex képzés közben színreakció jön létre. Ezt a reakciót használtuk a ferri redukciójának kimutatására. 1 mmol/l ferri vasat és 1 mmol/l ferrozint tartalmazó oldatba 1 mol/l glukózt vagy 1 mol/l arginint tettünk. Az oldat pH-ját 7,5-re állítottuk. A kísérletet három független sorozatban ismételtük meg.

##### 5.2.4.2.2. *Eredmények*

Mind a glukóz, mind pedig az arginin képes volt a ferri vas redukciójára (25. ábra). Az időfüggő görbék korrelációs koefficiense 0,98 volt a glukóz és 0,94 az arginin esetében. A redukció mértéke azonban gyorsabb volt glukóz jelenlétében mint az arginin esetében.

##### 5.2.4.2.3. *Összefoglalás*

Az arginin glikációja során az elektron származhat mind a glukózból, mind az argininből, de a gyorsabb reakciósebesség miatt sokkal valószínűbb, hogy a glukóz az elektron donor.



25. Ábra. A glukóz- és arginin-indukált ferri vas redukció időfüggése.

+ = glukóz-indukált redukció, ● = arginin-indukált redukció.

#### 5.2.4.3. Az arginin elektron donor képességének spin trap bizonyítéka (thesis XX)

Az előző pontban leírtak szerint az arginin is képes a ferri vasat ferrová redukálni. Feltételezhető, hogy ilyenkor a már említett Fenton reakcióban hidroxil szabad gyök is képződik. A hidroxil gyök kimutatására pedig alkalmas az un. spin trapping metodika.

##### 5.2.4.3.1. *Módszerek*

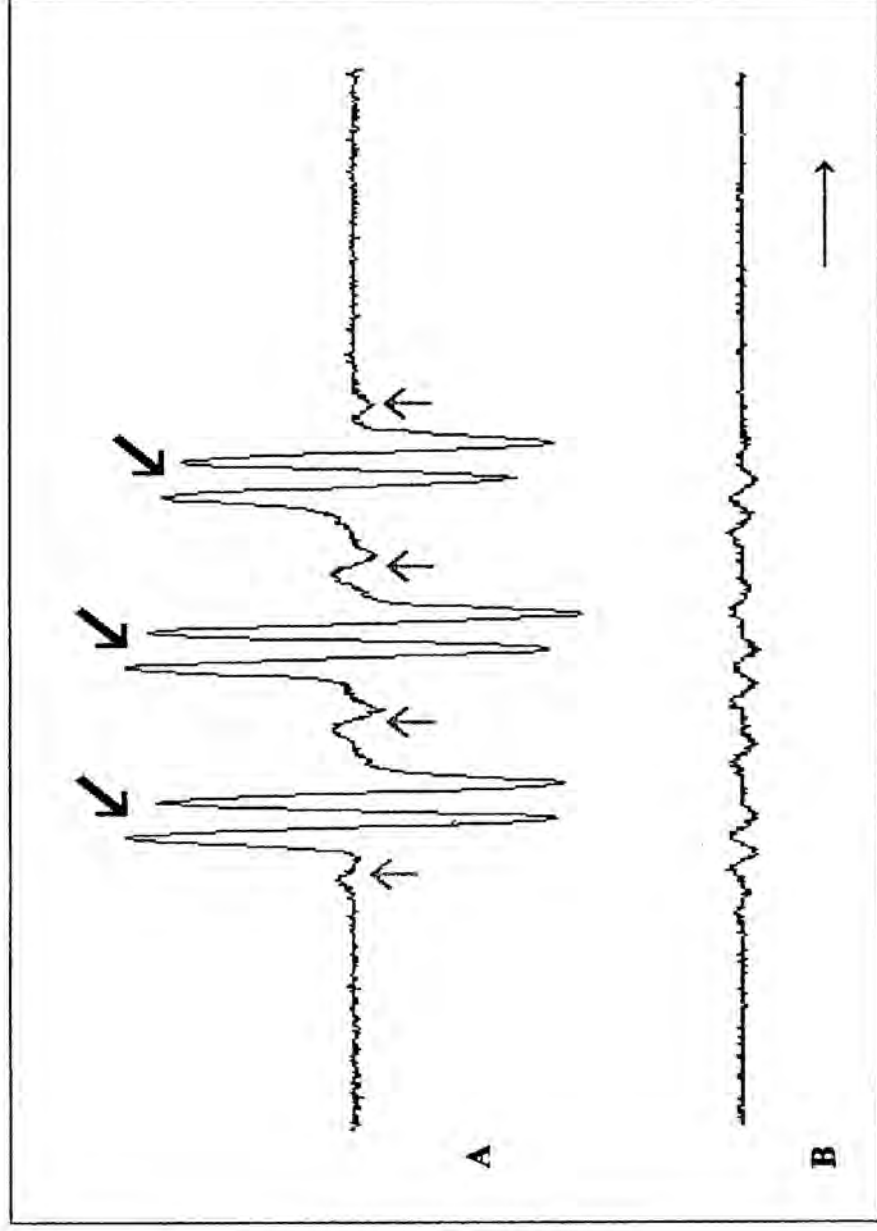
*N-t*-butil-fenilnitrón (PBN) spin trap-et használtunk a hidroxil gyök kimutatására, mivel ezen gyökcsapda jellegzetes ESR szignált ad ilyen körülmények között. 100 mmol/l arginint inkubáltunk 100 mmol/l PBN jelenlétében, szobahőmérsékleten. Mivel a PBN erősen zsírolékony, ezért a PBN-t alkoholban oldottuk, és ha így adtuk hozzá a vizes oldatokhoz, akkor már nem csapódott ki, hanem oldatban maradt. Az oldataink mindig tartalmaznak nyomokban vasat, ezért ezt külön nem adagoltuk az inkubációs médiumhoz. Inkább a nyomnyi mennyiségű vas redox ciklusát gátoltuk dezferrioxaminnal, megelőzve ezzel a Fenton reakció lejátszódását.

##### 5.2.4.3.2. *Eredmények*

Az arginin hidroxil és alkil szabad gyököt termelt (26. ábra). Dezferrioxamin meggátolta mindkét gyök képződését.

##### 5.2.4.3.3. *Összefoglalás*

Az itt leírt reakcióban az argininből leszakadó elektron szuperoxid termelésén, hidrogén peroxid képződésén keresztül a vasfüggő Fenton reakcióban hidroxil szabad gyököt keltett, és valószínűleg másodlagosan képződött az alkil gyök.



26. Ábra. Az arginin-keltett hidroxil- és alkil szabad gyök képződését dezferrioxamin gátolja. A gyökök csapdázására N-t-butil-fenilnitron (PBN) használtunk. A = 100 mmol/l arginin + 100 mmol/l PBN, B = 100 mmol/l arginin + 100 mmol/l PBN + 10 mmol/l dezferrioxamin. A piros nyílak a hidroxil szabad gyök, a zöldek az alkil szabad gyök jelére mutatnak.



#### 5.2.4.4. Az arginin guanidino csoportjának jelentősége (thesis XXI)

A továbbiakban azt tanulmányoztuk, hogy az arginin molekula melyik csoportja vesz részt a szabadgyökös reakciókban.

##### 5.2.4.4.1. *Módszerek*

Feltételeztük, hogy a guanidino csoport szerepe kitérítetett, ezért spin trap módszerrel vizsgáltuk az arginin guanidino csoportját nem tartalmazó, de ahhoz nagyon hasonló szerkezetű ornitin és citrullin szabad gyök képző tulajdonságát. Tanulmányoztuk a guanidino csoport szelektív modifikációját szobahőmérsékleten, malondialdehiddel 7,5-ös pH mellett, és a termék (pirimidinil-L-ornitin) képződésének kinetikáját az UV tartományban (304 nm) fotometriásan detektáltuk. A malondialdehidet 1,1,3,3-tetramethoxy-propanból savas hidrolízissel nyertük az alábbiak szerint: a 1,1,3,3-tetramethoxy-propan 164 µl-ét 9,836 ml 0,01 N HCL-ben 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 0,1 N NaOH-al a pH-t 7,5-re állítottuk. A reakció komplett voltát a TBA reaktív szubsztanciák módszerével ellenőriztük (88).

##### 5.2.4.4.2. *Eredmények*

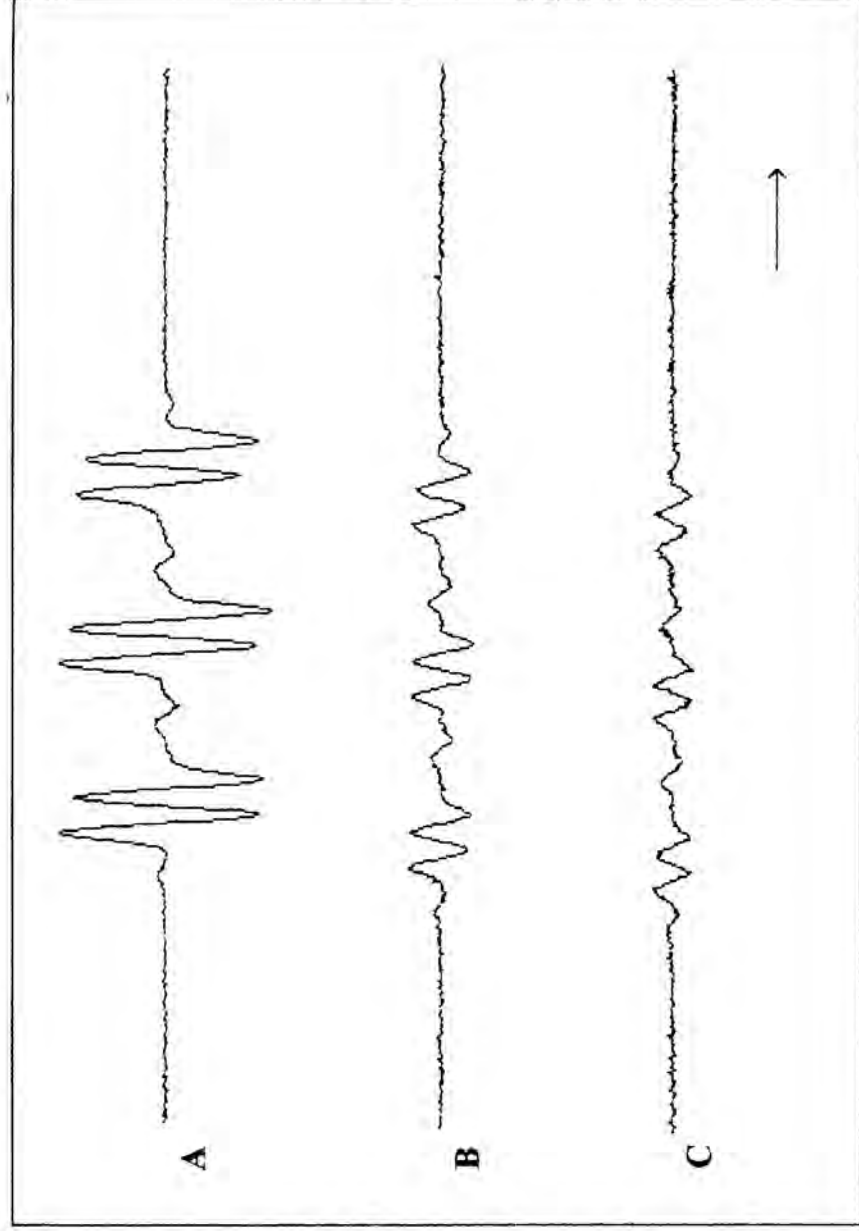
Ornitin és citrullin jelenlétében a hidroxil és az alkil szabad gyök képződésének üteme kifejezetten lassabb volt mint az arginin esetében (27. ábra).

Malondialdehid hatására fokozódott a hidroxil szabad gyök képződése arginin és PBN tartalmú közegben (28. ábra). A malondialdehid önmagában nem adott jelet.

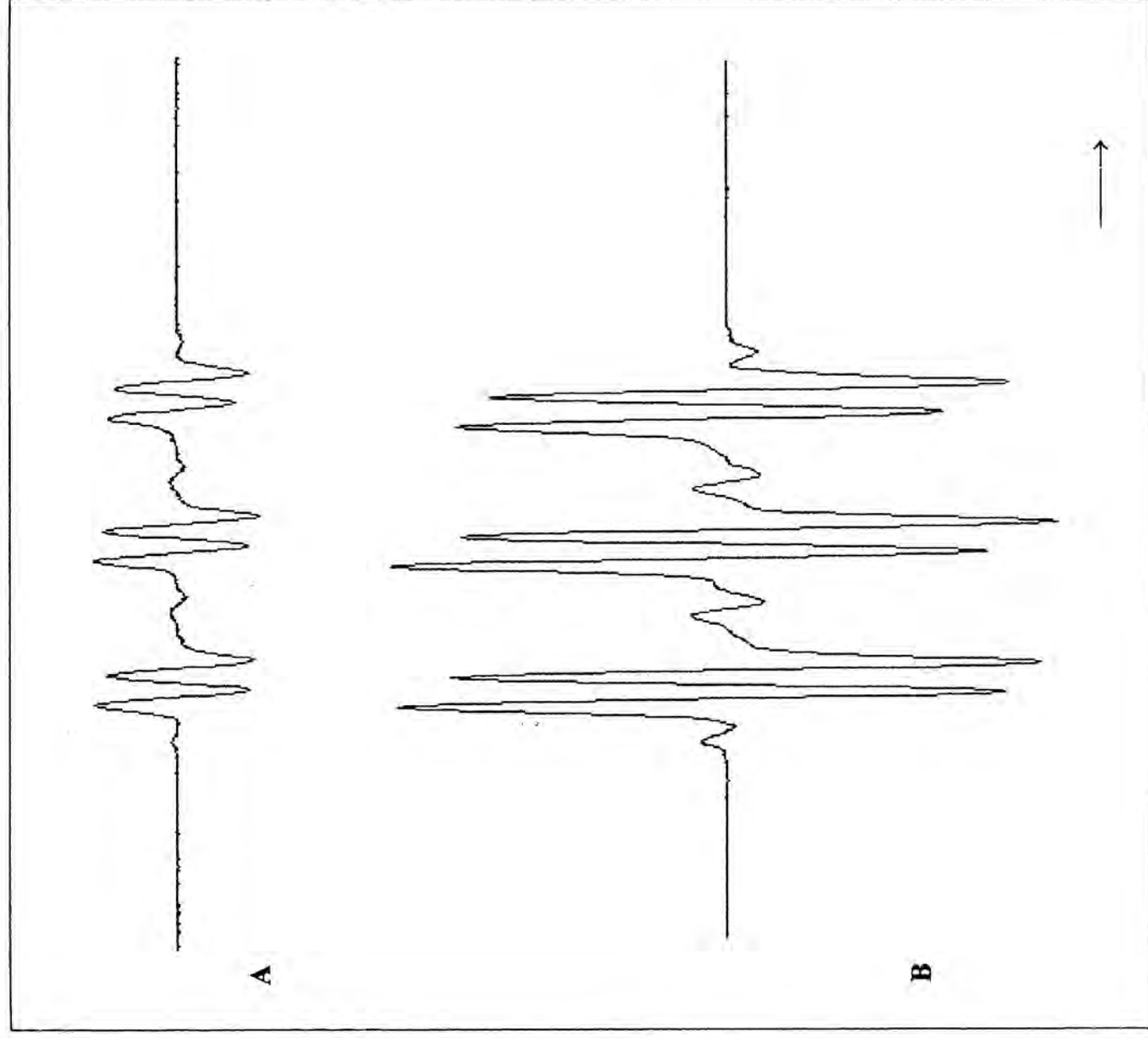
A fotometriás meghatározás szerint három órás arginin+malondialdehid, neutrális pH-n történt inkubációja után befejeződött a reakció a két molekula között, aminek az eredménye a már említett pirimidinil-L-ornitin. A reakciót az UV tartományban 304 nm-nél követtük (29. ábra).

#### 5.2.4.4.3. Összefoglalás

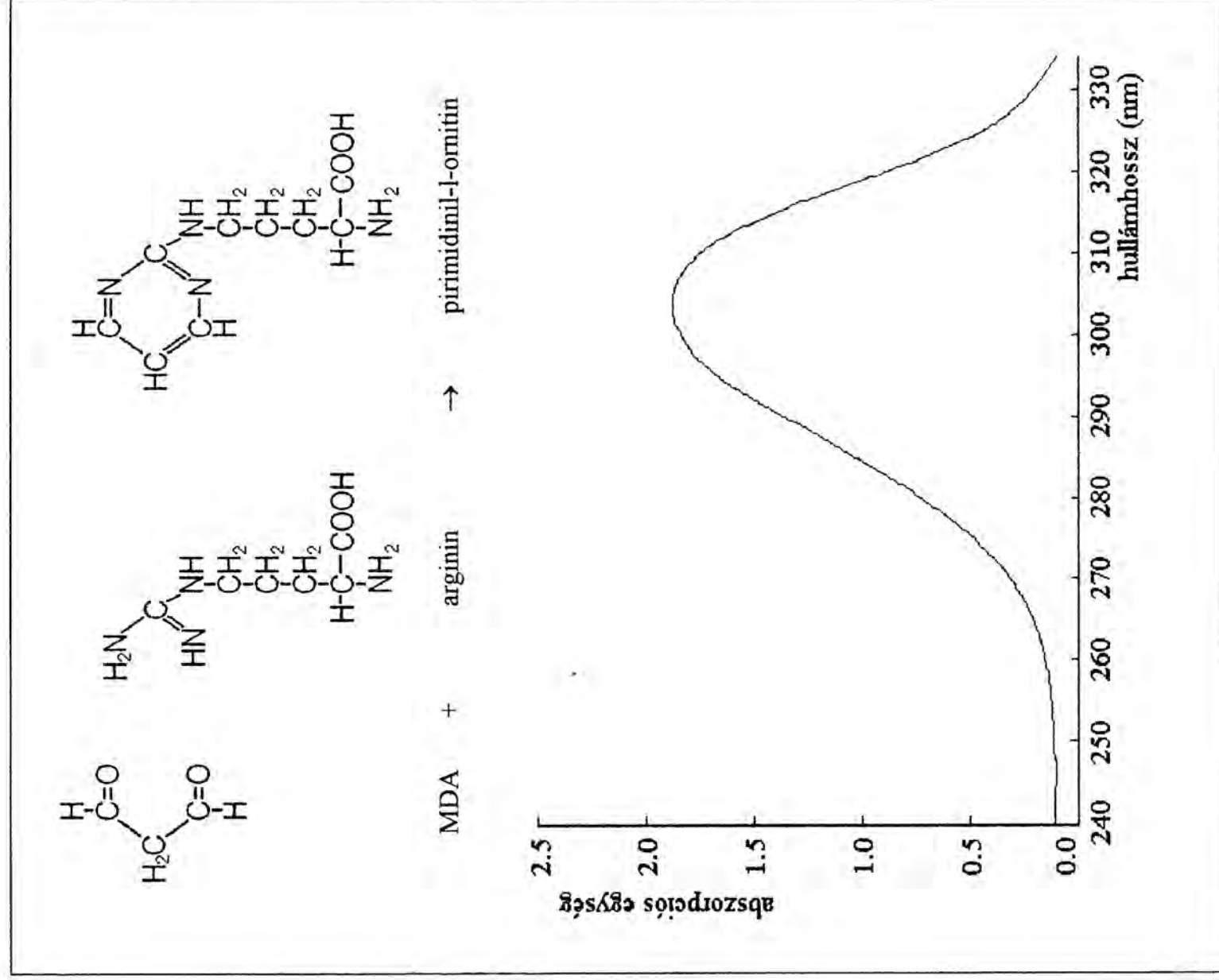
Az eredmények arra utalnak, hogy az arginin guanidino csoportja fontos szerepet játszik az arginin indukálta hidroxil és alkil szabad gyökök képződésében. A patológias körülmények között fokozottan termelődő malondialdehid fokozza a szabad gyök termelést, miközben az arginin módosítása miatt valószínűleg gátolja az NO produkciót.



27. Ábra. A guanidino csoport szerepe az arginin-indukálta szabadgyök-képződésben. A = 100 mmol/l arginin + 100 mmol/l PBN, B = 100 mmol/l ornitin + 100 mmol/l PBN, C = 100 mmol/l citrullin + 100 mmol/l PBN. 24 órá, szobahőn történő inkubáció utáni regisztrátumok.



28. Ábra. A szabadgyök-képződés növekedése a guanidino-csoport malondialdehiddel történő modifikálása után. A = 100 mmol/l arginin + 100 mmol/l PBN, B = 100 mmol/l arginin + 100 mmol/l malondialdehyd + 100 mmol/l PBN.



29. Ábra. Az arginin reakciója malondialdehiddel, a képződő pirimidinil-L-ornitin abszorpciós spektruma.

#### 5.2.4.5. A glukóz szabad gyök képződése (thesis XXII)

Ha az arginint együtt inkubáltuk szobahőmérsékleten glukózzal, PBN spin trap jelenlétében, akkor az arginin indukálta szabad gyök jelet a glukóz koncentráció függően csökkentette (30. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a glukóz itt scavangerként viselkedik, azaz olyan glukóz szabad gyökké alakul át az arginintől nyert elektronnal, amit a PBN-nel nem tudunk kimutatni.

##### 5.2.4.5.1. *Módszerek*

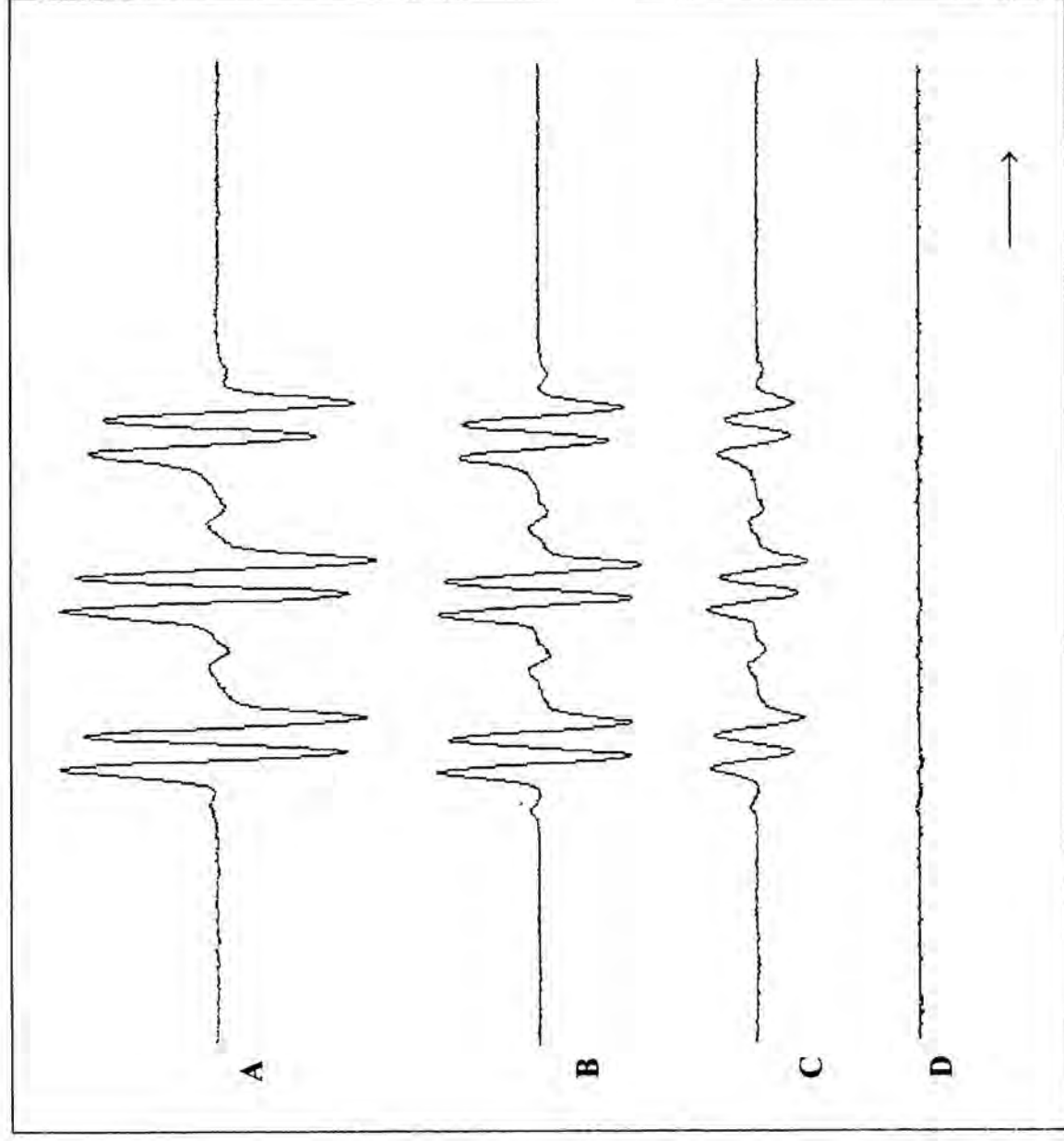
Az irodalomban leírt  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmú hidroxil szabad gyök generáló rendszerben (89) dimetil-1-pitrolin *N*-oxid (DMPO) spin trap alkalmazásával próbáltunk glukóz szabad gyökök kimutatni.

##### 5.2.4.5.2. *Eredmények*

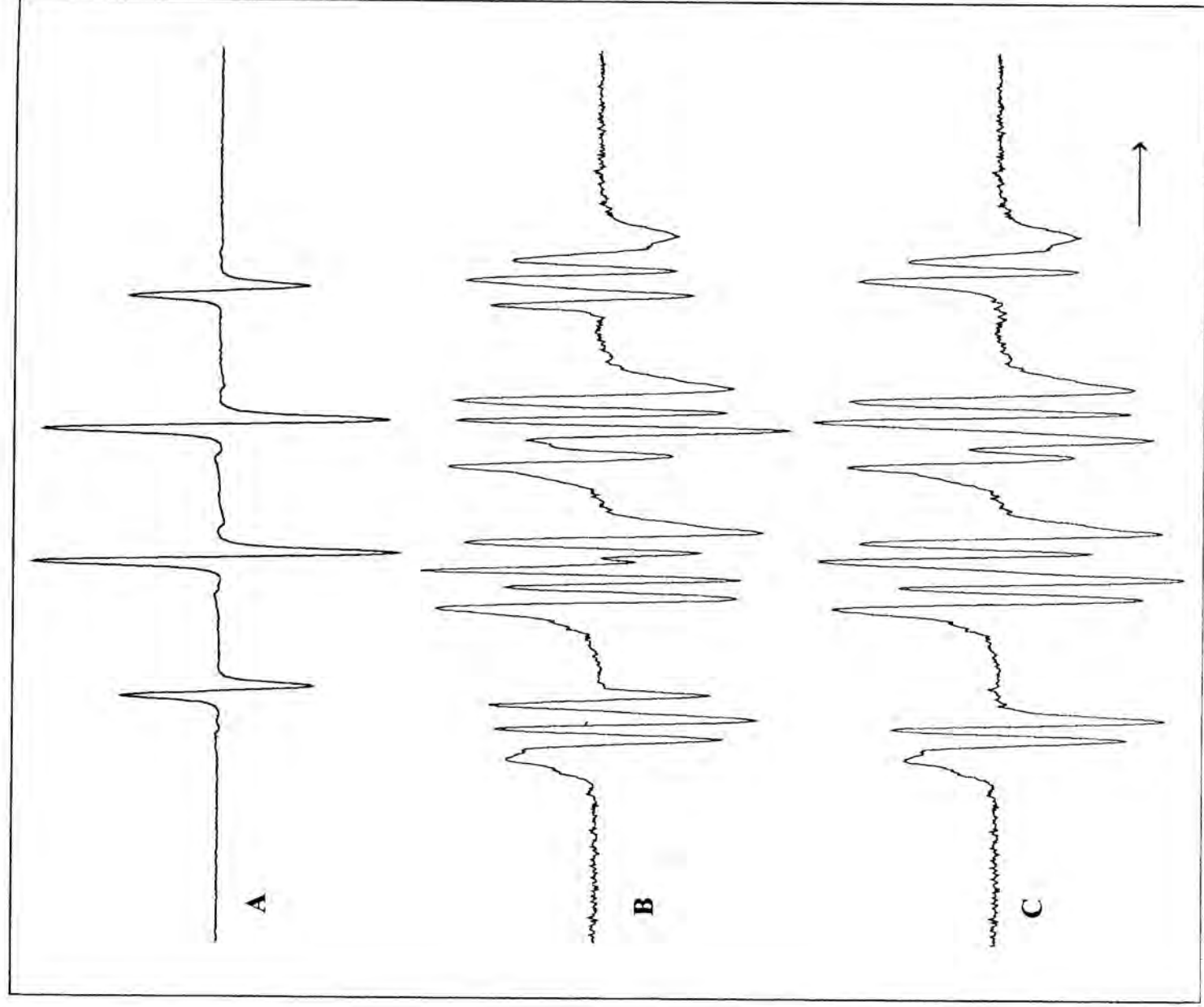
A módszereknél részletezett rendszerben a glukóz szabad gyök kialakulását igazoltuk hidroxil szabad gyök hatására (31. ábra). Feltehető, hogy a protein- és aminosav-glikációs folyamatokban ez az aktív, reakcióképes alakja a glukóznak.

##### 5.2.4.5.3. *Összefoglalás*

Hidroxil szabad gyök jelenlétében a glukóz scavangerként viselkedik és glukóz szabad gyökké alakul át.



30. Ábra. A glukóz scavenger hatása az arginin-indukálta szabadgyök-keltésre.  
 A = 1000 mmol/l arginin + 100 mmol/l PBN, B = 1000 mmol/l arginin + 100 mmol/l glukóz + 100 mmol/l PBN, C = 1000 mmol/l arginin + 1000 mmol/l glukóz + 100 mmol/l PBN, D = 1000 mmol/l glukóz + 100 mmol/l PBN.



31. Ábra. A glukóz scavanger hatása hidroxil szabad gyök generáló rendszerben.  
 A = 100 mmol/l dimetil-1-pirrolin N-oxid (DMPO) + 1 mmol/l ATP + 1 mmol/l  $\text{Fe}^{2+}$  + 1 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$ , B = 100 mmol/l dimetil-1-pirrolin N-oxid (DMPO) + 1 mmol/l ATP + 1 mmol/l  $\text{Fe}^{2+}$  + 1 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 1000 mmol/l glukóz, C = a B spektrumból kivontuk az A spektrumot.



## 6. MEGBEZÉLÉS

Eredményeink arra utalnak, hogy bizonyos esetekben az NO az inzulin celluláris hatásainak másodlagos hírvivője. Ennek az NO-hatásnak a kifejlődését gátolhatják mindazon folyamatok, amelyek szuperoxid szabad gyök termeléssel járnak, azáltal, hogy peroxinitrit képződéshez vezetnek. A NOS aktivitását gátolni lehetett úgy is, hogy sejteket dohányfüst okozta stressznek tettünk ki.

### 6.1. Az inzulin-NO hatása az ionmozgásokra

Korai megfigyelésünk, amely szerint a metilénkék gátolja az inzulin hatását, akkor nyert számunkra jelentőséget, amikor röviddel ezután felismerésre került, hogy a metilénkék gátolni tudja az NO hatás kifejlődését.

Még ma is fékezi az inzulin-NO rendszer kutatását az a már-már megkövesedett nézet, hogy ha intracelluláris inzulin-hatást vizsgálunk, akkor csak a fehérjék foszforilációjával kell törődnünk. Mind a mai napig nehezen fogadja el a szakmai közvélemény, hogy az az NO-cGMP rendszer, amely egyébként szintén fehérje-foszforilációkon keresztül fejti ki a hatását, jelentőséggel bírhat az inzulinhatásban. Pedig egy, a közelmúltban megjelent, az inzulin indukálta fehérje foszforilációkkal foglalkozó összefoglaló is hangsúlyozza, hogy az inzulin metabolikus hatásainak intracelluláris kezdő lépései nem ismertek. (90). Az inzulin receptorhoz való kötődése után egyidejűleg jelenik meg foszforilációs (91) és defoszforilációs (92) hatás. Az inzulin számos metabolikus hatása a szerin/treonin foszfatázon keresztül valósul meg (93). Ez utóbbit aktiváló folyamatok kezdő lépései ismeretlenek.

Az utóbbi néhány évben vált ismertté, hogy az inzulin az inzulinszerű növekedési faktor-1-hez (IGF-1) hasonlóan növeli a vázizomzat vértáramlását (94, 95, 96, 97, 98). Világossá vált az is, hogy az inzulin és az IGF-1 ezen hatása NO dependens (99). Az inzulin, hasonlóan a többi agonistához, amelyek aktiválják a cNOS-t, kalcium beáramlást hoz létre az

endothel sejtekbe, és a cNOS aktivációja révén váltja ki a simaizomok relaxációját (100). Az endothelialis sejtek és a vaszkuláris simaizom sejtek tehát inzulin hatására NO-t termel, ami cGMP növekedésben nyilvánul meg (101).

Mi lehet a hatása az inzulin-kiváltotta NO-cGMP termelésnek az ionháztartásra? Az endothelium által termelt NO paracrin módon a vasculáris simaizom sejtekhez, endocrin módon a thrombocytákhoz és autocrin módon saját guanilát ciklázához jutva fejti ki hatását. Ennek ionális mechanizmusa a következőkben foglalható össze. A cNOS aktiválásához kalcium beáramlásra, és annak kalmodulinhoz való kötődésére van szükség. Ez a kalcium beáramlás gyorsan lezajló folyamat, melynek hatására NO termelődik. Az NO viszont csökkenti az agonista kiváltotta és a feszültség-dependens kalcium csatornák ionáteresztő képességét (102, 103, 104, 105). Diabeteses hypophosphataemiában ellentétes irányú változások lépnek fel (106), amit foszfát szupplementációval lehet megfordítani (107).

Más mechanizmusok is szerepet játszhatnak az intracelluláris kalcium koncentráció csökkenésében. Az NO-cGMP rendszer hatására aktiválódik a szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáza (108), ami a kalciumot a citoszolból a szarkoplazmatikus retikulumba transzportálja. Másrészt, inzulin hatására aktiválódik a  $Na^{+}$ - $K^{+}$ -ATPáz is, így csökken az intracelluláris  $Na^{+}$  koncentráció, ami csökkenti a  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  cseretranszportot, és ezért lesz kisebb a kalcium beáramlása a sejtbe ezen az úton (109). A  $Na^{+}$ - $K^{+}$ -ATPáz aktiválásában szerepet játszhat az inzulin hatására intracellulárisan megemelkedő magnézium szint (110), valamint az, hogy az inzulin növeli a  $Na^{+}$ - $K^{+}$ -ATPáz transzlokációját a plazma membránba (111). Mindezek a folyamatok az intracelluláris diffuzibilis ionizált kalcium szintjének csökkenéséhez vezetnek, ami a kontraktilis fehérjék és végeredményben a simaizomzat elemnyedését és vazodilatációt okoz. Ugyanakkor csökken az extracelluláris kálium és az intracelluláris nátrium koncentráció. Patkány szívizomsejten is sikerült igazolni, hogy az inzulin növeli az NO termelését (112). Feltételezhető, hogy izolált békaszíven végzett

kísérleteinkben az inzulin-kiváltotta NO termelődés okozta a  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$  aktiválódását. Az enzim hatására létrejött  $\text{K}^+$  beáramlás és a következményes hyperpolarizáció miatti feszültségfüggő kálium csatoma-inaktiválás vezetett a felszíni kálium ion koncentrációjának csökkenéséhez. Az általunk alkalmazott metilénkék szuperoxid szabad gyököt termelve (113, 114), inzulin jelenlétében peroxinitritet keltett, és így inaktiválta az inzulin kiváltotta NO-hatást. Ezáltal a metilénkék kivédte az inzulin-keltette kálium koncentráció-csökkenést.

### 6.2. Az inzulin-NO hatása thrombocyták ATP secretiojára

Hasonlóan az érfal felépítésében szerepet játszó endothel és símaizom sejtéhez, a thrombocyták is NO-t és cGMP-t termelnek inzulin hatására (115, 116). A thrombocyták által termelt NO gátolja a TCT aggregációt és ATP secretiót (117), ami jelentős szerepet játszik az érfal integritásának fenntartásában. Ismert, hogy a thrombocyták aggregációja és ATP secretioja nem független egymástól (118). Az aggregáció ATP secretiót vált ki, és fordítva, az aggregáció-gátlása az ATP secretio csökkenésével jár együtt. Ezért nem volt meglepő számunkra, hogy az irodalomból ismert, inzulin-kiváltotta aggregáció gátlás mellett, az ATP secretio gátlását is igazolni tudtuk. A thrombocytákból felszabaduló ATP az endothelsejtek purinerg receptoraihoz kötődve NO termelést indukál, ami korlátozza a vételemezke aggregációt. Ez a folyamat kulcsfontosságú a szöveti perfúzió egyensúlyának fenntartásában.

Magyarzatot érdemel a vizsgálatok során alkalmazott anyagok koncentrációja is. Az aggregációs modellben csak mikromólos koncentrációjú agonistával lehet kiváltani effektust. A jelen esetben 3,13  $\mu\text{mol/l}$  volt az epinephrin koncentrációja, ami 10.000-szer magasabb, mint a fiziológiásan detektálható szint. Az effektív inzulin dózis 1,5 és 12  $\mu\text{mol/l}$  volt. Így a modellünkben tapasztaltak szerint az inzulin ekvimoláris koncentrációban hatékonyan gátolta az epinephrin-kiváltotta aggregációt és ATP szekréciót. L-argininből 10 mmol/l-es koncentrációt használtunk. Ismert, hogy az L-arginin nagyságrendekkel kisebb hatékonyságú

plazmában, mint mosott thrombocyta szuszpenzióban (119). Másrészt pedig ezen 10.000-szeres koncentrációjú epinephrin jelenlétében csak magas L-arginin szint lehet effektív. Az L-arginin hatása változatlan maradt az ozmolalitás 300 mOsm/l-re való beállítása után is, és az alkalmazott koncentrációban nem befolyásolta jelentősen a pH-t. A NOS kompetitív antagonistájának, az L-NA-nak a koncentrációja szintén problematikusnak tűnhet. Az első kísérlet, amely thrombocytákban NOS inhibitorral próbálta befolyásolni az inzulin hatását eredménytelen volt (120). Ennek az oka az lehetett, hogy túl alacsony koncentrációt választottak (30  $\mu\text{mol/l}$ ). Saját vizsgálatunkban 16 mmol/l-es koncentrációban használtunk az L-NA-t, 40 mmol/l L-arginin jelenlétében. Nagyobb koncentráció az L-NA-ból nem volt elérhető, kifejezett zsirolékonytsága miatt. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az inzulin hatása, legalábbis a vérlemezke aggregáció és ATP szekréció tekintetében, NO függő folyamatnak tűnik.

### 6.3. Az inzulin hatása a thrombocyta eNOS izoenzimre

Az NO meghatározása biológiai rendszerekben sokszor nehézségekbe ütközik, mivel a sejtekben levő cNOS enzim által termelt NO koncentrációja a nanomol/l-es koncentráció tartományba esik, ahol az általánosan használt Griess reakció nem elég érzékeny. Ezért új módszer kidolgozása vált szükségessé. Könnyen kivitelezhető metodikát írtak le, amelyek során az NO-t peroxinitritté alakították, és ezt mérték luminol kemilumineszcenciával (121). Az új módszerrel a leukocyták peroxinitrit termelését is mérni lehetett (122). Az általunk, a thrombocyták peroxinitrit termelésének kimutatására kidolgozott eljárás szenzitív és szelektív módszernek bizonyult. Szenzitív, mert a fiziológiás, éhgyomri plazma inzulin szintet megközelítő 84 pmol/l-es koncentráció hatását már kimutajta. Szelektív, mert az általunk alkalmazott körülmények között, desferrioxamin jelenlétében, csak a peroxinitrit képes a luminol oxidációját kiváltani, és sem lipid peroxidáció, sem hidroxil szabad gyök, vagy

hidrogén peroxid nem volt képes reakcióba lépni a luminollal. Ez a metodika alkalmas, olcsósága és gyors kivitelezhetősége miatt, nagyobb beteganyag thrombocytáinak tesztelésére is.

Felmerül azonban a kérdés, miért tapasztaltunk egyidejű szuperoxid és NO termelést a thrombocytákban? Van-e hatása annak az NO-nak, amely szuperoxid szabad gyökkel együtt keletkezik?

Újabbban került felismerésre, hogy a NOS enzim elektron transzportja bizonyos körülmények között "szétkapcsolódik" (123). 100  $\mu\text{mol/l}$ -es arginin koncentráció alatt a NOS növekvő mértékben termel szuperoxid szabad gyököt (124), ami 10  $\mu\text{mol/l}$ -es arginin koncentráció esetén meghaladja az NO keletkezés mértékét (125). 10-100  $\mu\text{mol/l}$  között az enzim NO-t és szuperoxid szabad gyököt is termel, ami peroxinitrit képződéshez vezet (126). Az intracelluláris arginin koncentrációs-viszonyokról kevés információnk van, de becslések szerint egyes sejten belüli kompartmentekben akár több száz mikromólos koncentrációk is kialakulhatnak (127, 128). A NOS  $K_m$  érték az argininre nézve hozzávetőlegesen 5  $\mu\text{mol/l}$  (129), ezért nehéz elképzelni, hogy NOS enzim szubsztrát hiány előfordulhat. Ugyanakkor arginin nagy dóziséval megszűntethető volt a NOS szétkapcsolt állapota (130). Saját kísérleteinkben argináz adása, ami az arginin szintet csökkenti, a PRP+dezferrioxamin+luminol rendszerben önmagában peroxinitrit jelet adott. A felsorolt adatok arra utalnak, hogy a thrombocytában is megtalálható eNOS enzim (131,132, 133, 134) mind NO mind szuperoxid szabad gyök termelésére képes, és ez utóbbit elsősorban az extracelluláris térbe secretálja. Ha ez egyidejűleg történik, akkor extracelluláris peroxinitrit képződhet. Továbbra sem megoldott az a kérdés, hogy hogyan fokozza az inzulin egyszerre mindkét gyök produkcióját? Ha a peroxinitrit nem aktiválja a szolubilis guanilát ciklázt, akkor hogy lehet az, hogy az inzulin mégis NO dependens módon emeli a thrombocytákban a cGMP-t (115)? Egy lehetséges magyarázatként szolgálhat az a megfigyelés, hogy a

thrombocyták által termelt NO nem lép ki a vérlemezkékből (119). Kísérleteink alapján talán helyesebb azt mondani, hogy a thrombocyták által termelt, intracellulárisan ható NO csak szuperoxiddal kapcsolódva, peroxinitrit formájában kerül ki a vérlemezkékből, amit a szokásos NO detekciós módszerek nem érzékelnek. PRP-vel végzett kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az L-NAME és a SOD is azonnal csökkentette az inzulin kiváltotta lüminol-chemiluminescencia-növekedést, nem volt szükség inkubációs időre, ami alatt a thrombocyták felvették volna az L-NAME-et és a SOD-ot. Ez a tény arra utalhat, hogy az általunk kimutatott peroxinitrit az extracelluláris térben képződött, mely egybevág azzal a nézettel, hogy a thrombocyták endothelialis NOS enzimet tartalmaznak (131, 133, 134, 135). Az endothelialis NOS enzim ugyanis az endothelium- és szívizom sejtekben a membrán egy speciális részéhez, az un. caveola-hoz kötődik, ami a plazma membrán invaginációs helye (136, 137). A membránban működő eNOS enzim a termelt NO-t mind a sejtbe, mind pedig az extracelluláris térbe képes transportálni. A szuperoxid szabad gyök secretioja, úgy tűnik, hogy a thrombocytákban az extracelluláris tér felé történik, hiszen az inzulin az NO-n keresztül növeli a cGMP intracelluláris mennyiségét, amire a peroxinitrit nem képes. Az extracelluláris térben több úton is megnőhet a szuperoxid szabad gyök koncentrációja: vagy az eNOS hatására, a plazmamembrán szoros közelségében termelődött szuperoxid passzálja a membránt az anion csatornákon keresztül (138), vagy az eNOS képes szuperoxidot direkt módon az extracelluláris térbe juttatni, vagy pedig a plazmamembránon keresztül történő elektrontranszport aktivációja következik be inzulin hatására, ami szuperoxid termelődéshez vezet az extracelluláris térben (139, 140).

Az endothelsejt, agonista hatásra, NO-t secretal az extracelluláris térbe, ami thrombocyta aggregáció gátlást, a simaizomzat relaxációját, és végeredményben vazodilatációt okoz. Az eNOS enzim caveola membránhoz való kötődését zsírsavval, nevezetesen palmitáttal történő acilációja biztosítja (141, 142), ezért csak detergens

jelenlétében mobilizálható. Kísérleteink alapján felmerül annak lehetősége is, hogy thrombocytákban az eNOS a palmitáció következtében, legalábbis részben, transplazmamembrán fehérjévé válik, és így közvetlenül képes érintkezni az extracelluláris térrel, hiszen az L-NAME gátló hatása a thrombocyták peroxinitrit produkciójára azonnal jelentkezik.

Az enzim inaktív mindaddig, amíg, agonista hatásra, a hozzákötődő caveoláris fehérje, a caveolin le nem válik róla. Utóbbi úgy jön létre, hogy az agonista hatására beáramló kalcium kalmodulint köt, és a kalcium-kalmodulin kompetitív módon leszorítja a caveolint a NOS-ról (143). Az endothelium sejteken az agonisták receptorai (muszkarin m2, bradikinin B2 receptor) a caveola-n, vagy a caveola-hoz közeli membrán felszíneken helyezkednek el, biztosítva ilymódon a postreceptorális hatás kifejlődését intracellulárisan (144, 145, 146). A caveola felszínén található az inzulin receptora is, mely szerepet játszik az inzulin transzendotheliális transzportjában is (147). Tartós agonista hatás esetén az eNOS depalmitálódik, és ezzel kiszakad aktív helyéről, a caveola-ból, megszakítva az NO termelést. Kísérleteinkben láttuk, hogy az inzulin indukálta NO produkció 2-3 perc alatt lezajlott. Annak ellenére, hogy a kísérleteinkben tapasztaltakkal szorosan egybevágunk az irodalom eNOS-ról leirt adatai, meg kell jegyeznünk, hogy ezidáig a thrombocytákban nem vizsgálták a caveola jelenlétét.

#### 6.4. A dohányfüst gátló hatása a NOS-GC-cGMP rendszerre

Kísérletes gyomorfekély modellben a dohányfüst csökkentette a vérátáramlást és a konstitutív NOS aktivitását (148). Az általunk használt dohányfüst-modell révén nyert eredmények arra utalnak, hogy a dohányfüst az endotheliumsejt cGMP termelését a kritikus

tiol csoportok oxidációja révén gátolja, melyet friss irodalmi adat is igazol (149). A dohányfüst az NO-GC-cGMP jelátvitel több pontján képes hatni, mivel a működéshez szükséges tiol csoportok a rendszer több lépésében is megtalálhatók. Sőt már az NO termelődése előtti szakasz, az NO-produkciót indukáló, agonista-kiváltotta kalcium-beáramlás károsodhat az endothel sejtekben az oxidatív stressz hatására (150). A dohányfüstben tiol csoportot károsító tényezőt mutattak ki (151), amely például az SH-enzim glukóz-6-foszfát dehidrogenázt (152) az acetaldehid dehidrogenázt (153) és a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt is (154) gátolni képes. A glukóz-6-foszfát dehidrogenáz gátlása súlyosan rontja a sejtek antioxidáns kapacitását, mert a pentóz foszfát anyagcsereút működése romlik ezáltal, és így az ott termelődő NADPH mennyisége is csökken. A NADPH kofaktora a glutation reduktnak, így NADPH hiányban csökken a redukált glutation szintje. Ugyanakkor a NADPH kofaktora a NOS enzimnek is, tehát csökkent koncentrációja esetén kisebb az NO termelés is. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gátlása miatt csökken a glikolízis által termelt piruvát mennyisége, a citrát-ciklus aktivitása és így az ATP termelés is. Mind az ATP hiány, mind pedig a tiol oxidáció (155) a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase aktivitásának csökkenését okozza, ami azután az intracelluláris ion homeostasis megbomlásához, a nátrium ion koncentráció növekedéséhez vezet. Ugyanez a mechanizmus a simaizomsejtekben is lejátszódhat, ahol az intracelluláris nátrium ion koncentráció növekedése aktiválhatja a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cseretranszportot (156), ami növeli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt, kontrakcióhoz és vazokonstriktióhoz vezetve. Ez is oka lehet a dohányzás vényomást emelő hatásának. A tiol csoport a guanilát cikláz enzim aktivitásához is szükséges (157). A fehérjék szabad tiol csoportjainak oxidálása révén fehérje-fehérje interakció jöhet létre, és ezáltal nagymolekulású polimerek is keletkezhetnek. Mésrészt viszont, a szabadgyökös reakciókban fehérje fragmentáció is kialakulhat.



A dohányfüstben számos oxidáló tulajdonságú anyag is kimutatható, közöttük  $H_2O_2$  (158). Feltételezhető, hogy a  $H_2O_2$  az endotheliumsejtek károsodásának egyik mediátora (159). A  $H_2O_2$  a Fenton és a Haber-Weiss reakcióban hidroxil szabad gyököt képez. Ezen reakciókat vas katalizálja. Kísérleteinkben azonban a kataláz, a SOD és a dezferrioxamin nem gátolta a dohányfüst-kiváltotta cGMP termelés csökkenést. Mivel a dezferrioxamin a lipid peroxidációt is gátolja, ezért valószínűsíthjük, hogy modellünkben sem a szuperoxid-, sem a hidroxil szabad gyök, sem pedig a lipid peroxidáció nem tehető felelőssé a cGMP termelés csökkenéséért. A GSH nem specifikus scavengerként a legtöbb oxidáló ágenszt képes elfogni. Így például gátolja a dohányfüstben nagy koncentrációban jelenlevő nitrogén oxidok (NO, peroxinitrit: ONOO<sup>-</sup>, nitrogén dioxid szabad gyök:  $\cdot NO_2$ , nitrit anion:  $NO_2^-$ ) hatását is. Meglepő, hogy a dohányfüst nagy NO koncentrációja ellenére az endothelsejteket nem cGMP növekedést, hanem csökkenést okozott. Ennek a magyarázata abban lehet, hogy a dohányfüst-puffer preparálása során a dohányfüst vizes extraktuma kb. 10 percet állt, mielőtt a sejtekkel kapcsolatba került. Ez idő alatt az NO átalakulhatott, hiszen féléletideje oxigén jelenlétében néhány secundum. Ugyanez lehet a sorsa a dohányfüstnek a szervezetben és az NO-nak is. A dohányfüst inhalálása után a vér vörösvértestjei gyorsan  $NO_2^-$ -vé, majd  $NO_3^-$ -á alakítják az NO-t, miközben oxidatív stressz lép föl bennük (160). Így a tüdőben történő expositio hatását a vörösvértestek transportálják a tüdőtől távoli szervekbe is. Természetesen ezek a szabadgyökös folyamatok elsősorban a vörösvértestekkel közvetlen kapcsolatba kerülő endothelsejteket érintik. Az oxidatív stressz miatt a haem kiszabadulhat a vörösvértestekből és a szabad gyökök direkt (161), vagy indirekt módon (az LDL oxidálása következtében), károsíthatják az endothelsejteket (162).

A cigaretta füstben nagy mennyiségű formaldehidet tudunk kimutatni. A formaldehid alapvetően két mechanizmus segítségével képes károsítani a fehérjéket. Egyrészt

keresztkötéseket létesít a fehérjék aminoszoptortjai között, másrészt a tiol csoporttal reagál. A GSH elfogyását vizsgálva a GSH fogyási görbe korrelációs koeficiensét  $r = -0,99$ -nek találtuk, ami azt támasztja alá, hogy a GSH és a formaldehid 1:1 arányban reagál el egymással. Ezek alapján valószínűnek tartjuk, hogy kísérleteinkben a GSH protektív hatása az által is kifejlődhetett, hogy gátolta a dohányfüst formaldehid tartalmának károsító effektusát.

Az általunk kidolgozott modellekben (bradikinin-endothelium és inzulin-thrombocytarendszer) a cGMP termelésért az NO-aktiválta solubilis guanilát cikláz volt felelőssé tehető. In vivo azonban a szérumban vagy a vizeletben kimutatott cGMP mennyisége nem áll arányban az NO termeléssel. Az NO-independens, membránhoz kötött, A és B típusú guanilát cikláz, atriális nátriuretikus peptid vagy C-típusú nátriuretikus peptid hatására, NO termelése nélkül, közvetlenül növeli a cGMP szintet (163). A D-, E-, és F-típusú guanilát cikláz működése még kevésbé ismert.

Az aktív eNOS izozim dimer alakban fordul elő (164, 165). SDS-PAGE módszer során bekövetkező denaturációval a monomer molekulásúlya 135 kD (166). Mosott thrombocyták és endothelsejtek esetén 270 kD (szintén eNOS-t tartalmaznak, lásd előzőekben), molekulásúlyú fehérje eltűnését észleltük dohányfüst hatására natív-PAGE módszerrel. A fehérje eltűnése a dohányfüst koncentrációjától függött (16. ábra). Endothelsejtek esetében a 270 kD molekulásúlyú fehérje eltűnésének a dohányfüst expozíció idejétől való függését mutattuk be (17. ábra). Ezen fehérje eltűnése gyorsítható GSSG hozzáadásával, és GSH kezeléssel kivédhető volt. Feltételezzük, hogy a megfigyelt fehérje-eltűnés kapcsolatba hozható az eNOS enzim gátlásával, amire előző kísérletünkben a cGMP termelés csökkenése utalt. A cGMP-mérés során találatokkal megegyezett ezen kísérletünk abban is, hogy egyéb scavengerek hatástalanok voltak. Az eNOS károsodásának bizonyítására Western blot analízis elvégzését tervezzük.

### 6.5. Szabad gyök termelés a pseudohypoxia modellben

Ismert, hogy a hepatikus glukóz kiáramlást gátolja a hyperglycaemia (167). Legújabbban azt is hangsúlyozzák, hogy glukóz mediálta autoregulációról, és nem inzulin-hatásról van szó, és hyperglycaemiás clamp eljárással a hyperglycaemia direkt G6Páz gátló hatását is igazolták (168). A G6Páz gátlása magyarázatot adhat a hepatikus glukóz kiáramlás autoregulációjára, hiszen a glukóz kiáramlás kulcsenzime a G6Páz, amelynek működése teszi lehetővé a glukóz kijutását a májsejtből. A G6Páz hyperglycemia kiváltotta gátlásának elképzelhető módja pl. metabolikus intermedier gátlás. Huszonöt glukóz metabolitot vizsgálva sem találtak azonban olyat, amely fiziológias vagy pathofiziológias koncentrációban gátolni tudta volna a G6Páz (169). Gátolható az enzim aktivitása lipid peroxidációval is (55). Számos adat utal arra, hogy a hyperglycemia megváltoztatja az intracellularis redox statut. Megemelkedik a  $\text{NADH/NAD}^+$  arány, amit a hyperglycaemias pseudohypoxia kifejezéssel jelölnek, mivel ugyanez a redox változás figyelhető meg a hypoxiás sejtekben is. Mind a hypoxiát, mind pedig a pseudohypoxiát egyben szabadgyökös folyamatok megindulása is jellemzi (65). A  $\text{NADH/NAD}^+$  arány emelkedése hyperglycemias (30 mmol/l-s vércukor szint) patkány máj sejteinek cytoplasmájában is megfigyelhető (170). A szabadgyökös károsodás kialakulását valószínűsíti az a tény is, hogy diabetesben az elektron donor NADH felszaporodásával egyidőben vas anyagcsere zavar is megfigyelhető (66). Az elektron felvételre és leadásra képes vas ezen redox ciklus kapcsán lipid peroxidációt és szuperoxid szabad gyök termelését indíthatja meg (55). A hyperglycemiát (pseudohypoxia) imitáló körülmények (NADH emelkedés) között a G6Pase aktivitása csökken. A gátlás mértéke (26-33 %) kvantitatively is megegyezik az in vivo, hyperglycaemias clamp metodikával nyert adatokkal (26 %, (168)). A ferri-ATP alkalmazása nem fokozta szignifikánsan a gátlást, jelezve, hogy nyomnyi mennyiségű vas jelenléte elegendő a hatás kifejlődéséhez, annyi, amennyi a microsomában a preparálás során marad. A G6Páz gátlását a NADH közegben

lipid peroxidáció idézheti elő, hiszen a SOD, a kataláz és a DMSO ineffekív, a BHT, Trolox és a GSH effekív volt. Ha ferri-EDTA komplex jelenlétében vizsgáltuk a G6Páz aktivitását, azt találtuk, hogy a Tris-HCl puffer scavenger tulajdonsága miatt nem volt változás NADH jelenlétében. Kihagyva a Tris puffert, enzim aktivitás csökkenés volt kimutatható NADH jelenlétében, amelyet feltehetően hidrogén peroxid és/vagy hidroxil szabad gyök okozott, hiszen kataláz-érzékeny volt, a DMSO és etanol mérsékelte a G6Páz károsodást, a SOD és a BHT pedig ineffekív volt.

A hepatikus glukóz kiáramlás három gátló tényezője a hyperglycaemia, az inzulin és a paraszimpatikus stimuláció (167). Ez utóbbi acetilkolin jelátvitelt jelent, aminek a másodlagos hírvivője az NO. Eredményeink arra utalnak, hogy az NO szerepet játszik az inzulin hatás kifejlesztésében is. Feltételezhető, hogy kísérleteinkben a ferri-EDTA közegben a hidrogén peroxid a szuperoxid szabad gyök dizmutációjával termelődött. Az NO + szuperoxid kapcsolatból peroxynitrit termelődhet, ami, szemben az NO-val, már nem képes aktiválni a guanilát cikázt, és így nem fejlődik ki az agonista hatása. Így a paraszimpatikus- és az inzulin-mediálta hepatikus glukóz kiáramlás-gátlást az előzetesen fellépő hyperglycaemiák, szabad gyökök termelését indukálva, befolyásolhatják, dezinhibíciót okozhatnak. Ezen folyamatok eredőjeként egy adott pillanatban a diabeteses betegnél normál, csökkent vagy emelkedett hepatikus glukóz kiáramlást lehet mérni. A hyperglycemia kiváltotta hepatikus glukóz kiáramlás-csökkenés oka a NADH emelkedéséből eredő lipid peroxidáció és/vagy hidroxil szabad gyök okozta G6Páz gátlás is lehet.

#### 6.6. *A nem-enzimatisz glikáció*

Az öregedés során és diabetes mellitusban hasonló pathomechanizmus figyelhető meg; a nem-enzimatisz glikáció és az oxidatív stressz. Ezek a folyamatok cukorbetegségben

felgyorsulnak, azaz a diabetes mellitus felgyorsult öregedést jelenthet (171). A diabeteses beteg szöveti fehérjéi, az *in vitro* glikált fehérjék, a röntgen besugárzásnak kitett enzim és a hidrogén peroxid-réz rendszerben oxidált fehérje patológiás fluoreszcenciája megegyezik (62, 172). A szabadgyökök által károsított szövetekből nyert fehérjék 360 nm-es excitáció mellett 454 nm-nél mutatnak emissziós maximumot, ugyanúgy mint a diabeteszes szövetek (excitáció: 350-370 nm, emisszió: 440-460 nm) (173). Ezen adatok megismerése óta egyre többen beszélnek az ún. karbonil stressről (174, 175). A karbonil stress a fehérjék, aminosavak és/vagy foszfolipidek nem enzimatis glikációjának és az oxidatív stressnek a közös 'végkifejlete'. Az oxidatív stress során termelt leglényegesebb karbonilok a malondialdehid és a 4-hidroxinonenal (176). Érdekes megfigyelés, hogy az aldóz redukáz enzim, mely diabetes mellitusban indukálódik és katalizálja a sorbotol anyagcsereút első lépését, a 4-hidroxinonenalt nem-toxicus alkohollá képes átalakítani (177). A malondialdehid, amit a lipidperoxidáció kizárólagos markerének hittek sokáig, aminosav (arginin, glutaminsav, prolin stb.) és dezoxiribóz oxidatív károsodása révén is termelődhet (178).

A nem-enzimatis glikáció során keletkező leglényegesebb karbonilok a glukoazon, a dezoxiglukoazon (179), a glioxál-metilglioxál (180, 181, 182), a formaldehid és az acetaldehid (183). Az oxidatív stress és a nem-enzimatis glikáció során termelt karbonilok egyaránt Schiff bázist képeznek a fehérjék, aminosavak és a foszfolipidek aminosóportjával. Ez a lépés még reverzibilis, de intramolekuláris elektron átrendeződés révén irreverzibilissé válhat, az így keletkező vegyületeket Amadori termékeknek hívjuk. Az Amadori termékek intramolekuláris átrendeződése szabadgyökös degradációja, más aminosav aminosó- vagy az arginin guanidino csoportjához való kapcsolódása glikációs végtermékek (advanced glycation end-product, AGE) képződéséhez, vagy átmeneti fém jelenlétében a szuperoxid szabad gyök és glukóz esetében glukoazon termelődéséhez vezethet (184). Az AGE termékek egy része fluoreszkál, mint pl. a pentozidin (Ex:335 nm, Em:395 nm (185)), a crossline (370/440 nm

(186, 187)), és a vesperlysine A (370/440 nm (188)). Egyéb termékek nem fluoreszkálnak, mint pl. a karboxi-metil-lizin (189, 190), a glioxál-lizin dimer (GOLD (191)) és a metil-glioxál-lizin dimer (MOLD (192)). Ma már valószínű, hogy több tucat (száz?) AGE termék létezik

Az AGE termékek jelentősége az, hogy az elmondottak szerint oxidatív stresszt indukálnak maguk is, amellett, hogy szabadgyökös folyamatok termékei lehetnek. Ezzel együtt a fehérjék, foszfolipidek szerkezetét megváltoztatják, és funkciójukat rontják. Különösen érzékenyek ezekre a behatásokra azok a proteinek, amelyek lipidek is vannak, mint pl az LDL és az albumin (193). A serum (fruktózamin) és a vörösvértest fehérjéinek (haemoglobin A1c) glikációját felhasználjuk a betegek glycaemiás állapotának mérésére (194). Újabb szempont szerint a malondialdehid növeli a haemoglobin glikációját (195), vagy felmerül annak lehetősége is, hogy a használt módszerek nem szelektívek a glikációra és együtt mérik az oxidatív stresszből eredő protein-karbonil termékeket is kimutatják. Ez esetben hamisan magas haemoglobin A<sub>1c</sub> értéket detektálhatunk. A glikált fehérjék immunogén tulajdonságúak lehetnek és így keringő immunkomplexet képezhetnek. Ez utóbbi elősegíti a makrofágokon keresztüli eliminációjukat a keringésből (196), bár ismertek specifikus AGE receptorok is (RAGE), amelyek révén a különböző sejtek (endothelium, vese tubulus epithel, podocytá, makrofág, mesangium stb) az AGE-t fagocitálni képesek (197). A makrofágok fagocitózis után degradálják az AGE proteineket, különösen azokat, amelyek arginin csoportját metil-glioxál módosítja (198), majd az így keletkező ún. alacsony-molekulású AGE termékeket a keringésbe juttatják. A keringő alacsony-molekulású AGE termékeket a vese a vizelettel kiválasztja (199). Azokban a sejtekben, amelyekben az AGE felvételre kerül, aktiválódik egy citoszolikus transzkripció faktor, a nukleáris faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), és többek között növekedési faktorok, és extracelluláris mátrix proteinek termelődnek (200, 201).

Nagyrészt ezek a folyamatok tehetők felelőssé a diabeteses komplikációkért (atherosclerosis, nephropathia) és az uraemiás betegek atherosclerosisáért (202).

Az eddig elmondottak alapján azt lehetne gondolni, hogy az AGE metabolizmusnak két fő tényezője van, a szervezetben történő keletkezése és a vesén keresztüli eliminációja. Azonban újabb adatok arra utalnak, hogy a táplálék AGE tartalma képes felszívódni a gastrointesztinális rendszeren keresztül, és az így kívülről bejutott exogen AGE termékek semmiiben nem különböznek az endogén, *in vivo* képződöttéktől (203). Tehát az AGE metabolizmus harmadik vonatkozása az AGE bevitelle a táplálékkal. Saját argininnel és glukózzal kapcsolatos kísérleteink is elsősorban ehhez kapcsolódnak. Minden bizonnyal *in vivo* is lejátszódik a 22. ábrán bemutatott arginin glikáció, csak túl lassú a reakció sebessége ahhoz, hogy detektálható legyen. A keletkezett molekula, a pirazil gyök, vagy annak átalakulási termékének a jelentősége nem ismert.

Mivel az arginin glikációját a vas katalizálja, amely katalizist a ferri-ferro redukciót gátló dezferrioxamin megakadályozza, feltételezhetjük, hogy a folyamat melléktermékeként szuperoxid szabad gyök is termelődik, hiszen a ferro vas képes az oxigént redukálni. A ferri vas redukcióját direkt módon is igazoltuk szobahőmérsékleten, ferrozin használatával. Az így termelt szuperoxid szabad gyök hatástalaníthatja az inzulin-NO szignált, mint azt már a pseudohypoxia modellnél említettük. Az AGE-termékek NO-hatást gátló effektusa jól ismert (204).

Már a ferri-redukciós ábrán (25. ábra) is láttuk, hogy az arginin is képes a vasat redukálni, bár sokkal lassabban, mint a glukóz. Ezt a folyamatot ESR spin trap metodikával is igazoltuk. Látható volt (26. ábra), hogy arginin jelenlétében a az oldatokban mindig megtalálható nyomnyi mennyiségű vas elégséges volt ahhoz, hogy hidroxil és alkil szabad gyök keletkezzen már szobahőmérsékleten is. A hidroxil szabad gyök képződésének valószínű mechanizmusa a szuperoxid dizmutációból eredő hidrogén peroxid átalakulása lehetett a

Fenton reakcióban. Az arginin elektron donor képességét a guanidino csoport fokozhatja, hiszen az azzal nem rendelkező ornitin és citrullin lényegesen kisebb mennyiségű gyököt keltett. Ezt igazolja az is, hogy a guanidino csoport malondialdehiddel történő blokkolása (pirimidinil-L-ornitin) fokozta az arginin elektron donor képességét. Mivel a reakció pH 7-8 közötti végbement, a szerkezetben is számolnunk kell ennek a terméknek a képződésével pl. lipid peroxidáció kapcsán. Ez a jelenség is utal a glikáció és az oxidatív stressz kapcsolatára, hiszen vannak adatok, amelyek szerint a malondialdehiddel történő kezelés fokozza a fehérje glikációt (205). Ugyanakkor a malondialdehid reakció rávilágított arra is, hogy az arginin feltételezhető elektron donor csoportja a karboxil lehet, amely komplexálni tudja a ferri vasat (206). Nem zárható ki az aminosoport szerepe sem, mivel ismert a poliaminok nagy metál-komplexáló kapacitása (207). Néhány adat arra utal, hogy az aminosavak úgy képesek komplexálni átmeneti fémet, hogy az  $\alpha$ -aminocsoport és a karboxilcsoport is résztvesz a koordinációs kötés kialakításában (208). Ugyanezek a szerzők valószínűsítik az ilyen komplexek autooxidációs átalakulását is. Ezek alapján feltehető, hogy az arginin karboxil csoportjának szomszédságában lévő alfa-amino csoport magas hőmérsékleten glikálódik, amely reakciót a komplexált vas az említett módon a ferri-ferro átalakulással katalizálja. Teljességgel azonban nem zárható ki a guanidino csoport részvétele sem a reakcióban, és feltételezhető egy olyan állapot, amelyben két arginin molekula karboxil-,  $\alpha$ -amino- és guanidinosoportjának valamely nitrogén atomja komplexál egy vas atomot (a vas koordinációs száma 6). Az arginin  $\alpha$ -aminocsoportjának glikációját tartja valószínűnek az irodalom is (209).

Az arginin-vas komplex által termelt hidroxil szabad gyököt éppúgy el tudja fogni a glukóz, mint a vas-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben termelődöttet. DMPO-val igazolni tudtuk a glukóz szabad gyök képződését ezen reakció során. Feltételezzük a glukóz szabad gyök glukózhoz viszonyított nagyobb reakció készségét, ami újabb kapcsolat lehet az oxidatív stressz és a



glükáció között. Az oxidatív stress során termelődő glukóz szabad gyök valószínűleg fokozott mértékben képes a glikációt elindítani.

#### 6.7. Szabad gyökök és lehetséges új terápiás eljárások

Miért vállalkozik egy klinikus az előzőekben elsorolt elméleti tudományos kérdések megismerésére, vizsgálatára? Nyilvánvaló a válasz: azért, mert ezek révén új kezelési eljárások kidolgozására van lehetőség. Van-e szükség ezekre az új terápiás elvekre? Egyértelmű a válasz: nagy szükség van ezekre, hiszen az utóbbi idők jelentős terápiás előrehaladásai ellenére mind többen és többen szenvednek az inzulin rezisztencia szindrómában, és válnak ennek következtében a cardio-vascularis szövődmények és/vagy a veseelégtelenség áldozataivá. Ez korunk nagy epidémiája! Az alább részletezendő "nem-is-annyira-új" kezelési mód nem számíthat nagy gyógyszerügyi támogatásra, hiszen nincs benne profit, "csak" a beteg ember profitálhat belőle. Véleményünk szerint az életvitel változtatás az, ami populációs szinten mérhető egészségügyi javulást hozhat. Erre a legjobb példa az, hogy a múlt század végén és századunk elején nem a gyógyszeres terápia, hanem az életkörülmények javítása vezetett a tuberculosisos betegek számának jelentős csökkenéséhez. Természetesen nem vitatjuk az antituberkulotikumok hatalmas előrelépést jelentő szerepét sem.

Az életvitel változtatásán, az elmondottak alapján, elsősorban az eddig alacsony terápiás értékűnek tartott vitaminok megfelelő bevitelét értjük. Ezek között az anyagok között több nagyhatású antioxidáns, szabad gyök scavanger van. Úgy tűnik, hogy a jelenlegi megváltozott táplálkozási szokások mellett vagy nem elégséges az antioxidánsok bevitel, vagy nagyobb lett a szervezet antioxidáns igénye vagy túl sok szabad gyök termelődik, melyeket az antioxidáns rendszerek már nem képesek eliminálni. Szokás például a glukóz

toxicitásáról és ennek kapcsán fellépő vasculáris komplikációkról beszélni (210). Ennek lényege az, hogy az emberiség csak kb 100 éve, a cukorgyártás megindulása és alkalmazásának általánossá válása óta fogyaszt olyan nagy mennyiségű mono- és diszszaharidot. Az ember, mint biológiai lény ezzel a kihívással korábban nem találkozott. A mono- és diszszaharidok gyorsan felszívódnak, fogyasztásuk, ismétlődő, gyorsan emelkedő vércukor csúcsokat eredményez, és a disszertáció során említett kedvezőtlen jelenségeket indukálhatják: glikáció, pseudohypoxia. A monoszaharid fogyasztása egészségesekben (211) és diabetesesekben (NIDDM) vérmomás emelkedést is okozott, ami azonban egyidejű scavanger, GSH adásával kivédhető volt (212). Diabetesben a totális plazma antioxidáns kapacitás csökken (213), amely fokozott thrombosis hajlammal is jár (214). NIDDM-ben fokozott hidrogén peroxid képzést figyelhető meg és a thrombocyták fokozott aggregációját figyelték meg (215). Diabetes mellitusban a NOS enzim szétkapcsolásával és szabad gyökök termelésével is számolnunk kell, mert arginin adagolása csökkenti ebben a populációban a lipid peroxidációt (216). Kísérleteinkből az is valószínűsíthető, hogy főzés, vagy sütés során a fehérjék arginin tartalma fel nem használható formába alakul át és így a NOS szétkapcsolódása fennmarad, vagy romlik. Az ételek mind fejlettebb konyhatechnikai preparálása az aminosavakat és vitaminokat eloxidálhatja (már nem scavanger), és AGE képződést indukálhat a táplálékban. Különösen kedvezőtlen helyzet alakul ki, ha a diabeteses beteg dohányzik. A dohányzás ugyanis tovább rontja a szövetek inzulin érzékenységét (217, 218, 219) azoknál az egyéneknél, akiknél amúgy is inzulin rezisztencia tapasztalható. A kísérleteink során tapasztalt dohányfüst okozta NOS enzim inaktiválásnak valószínűleg szerepe lehet az inzulin rezisztencia kialakulásában is, hiszen bizonyítottuk, hogy az NO az inzulin bizonyos hatásainak transzmittere. Ugyanezen folyamatok okozzák a szabadgyökös károsodást a vesében, amit úgy hívunk, hogy diabeteses nephropathia (220).

Használjunk tehát, akár farmakológiai dózisban is, antioxidáns-vitaminokat, vagy/és arginint? A kérdés nem intézhető el azzal, hogy fogyjon le az obes beteg és végezzen rendszeresen fizikai aktivitást, akkor másra nem lesz szüksége. Azért nem egyszerűsíthető idáig a kérdés, mert betegeink nagy része nem tud lefogyni és nem tudja fokozni fizikai aktivitását (pszicho-szociális kérdések, mozgásszervi betegségek stb.). Örölük sem mondhatunk le, mint reménytelenekről!

Az antioxidáns vitaminok közül a legnagyobb csalódot a legperspektivikusabbnak tűnő C vitamin okozta. Kedvező cardio-vascularis hatását nem tudták egyértelműen igazolni (Health Professionals Follow-up Study (HPFS) 39.910 férfi 4 éves követése (221), Iowa Women's Study (IWS) 34.486 nő 7 éves követése (222), Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly (EPESE) 11.178 idős személy 8,5 éves követése (223)). Nem váltotta be a reményeket a  $\beta$ -carotin supplementáció sem, bár bizonyos körülmények között kedvező lehet (pl. dohányosoknál HPFS (221)). Több nagy prospektív tanulmány igazolta viszont az E vitamin ( $\alpha$  tokoferol) kedvező hatását a myocardialis infarctus primer- és secunder prevenciójában (HPFS (221), EPESE (223), Nurses' Health Study (NHS) 87.245 nővér 8 éves követése (224), IWS (222), összesen 172.819 bevont személy). Hasonló nagyságú populáción végzett tanulmány még nem áll rendelkezésünkre a veseszövődmény progressziójára gyakorolt hatás megítélésére. Az arginin és a glutation terápia vizsgálata ilyen szempontok szerint olyan új, hogy erről még nincsen megbízható adat.

Saját kísérleteink és a klinikai tanulmányok alapján magas rizikójú betegek (inzulin rezisztencia syndroma, dohányzás) számára javasolható 400-800 E/nap E vitamin szupplementáció. Az ilyenfajta egyoldalú beavatkozás az antioxidáns rendszerbe (bár így is a legtöbb gyógyszerünket meghaladó, 40 %-os koszorúsér-szívbetegség előfordulási arány csökkenés érhető el), valószínűleg nem hozza meg azt a hatást, ami elméleti megfontolások

alapján várható lenne, de megfelelő prospektív tanulmányok hiányában a komplex antioxidáns kezelés sémája még várat magára.

## 7. ÚJ EREDMÉNYEK

Az inzulín hatása, vagy hatásainak egy része a nitrogén monoxid rendszeren keresztül mediálódik

- I. Igazoltuk, hogy a nitrogén monoxidot inaktiváló metilénkék izolált béka szív modellben meggátolja az inzulín extracelluláris kálium ion koncentrációt csökkentő hatását.
- II. Igazoltuk, hogy az inzulín gátolja a humán thrombocyták ATP secretióját.
- III. Vizsgálataink szerint az inzulinnak a thrombocyták ATP secretiójára kifejtett gátló hatását a nitrogén monoxid szintáz enzim szubsztráija, az L-arginin potenciálja.
- IV. Új kemilumineszcenciás módszert dolgoztunk ki a nitrogén monoxid detektálására thrombocyta-dús plazmában.
- V. Kemilumineszcencia alkalmazásával kimutattuk, hogy az inzulín növeli a thrombocyták nitrogén monoxid termelését.
- VI. Kemilumineszcencia alkalmazásával igazoltuk, hogy az inzulín növeli a thrombocyták szuperoxid szabad gyök produkcióját.

A nitrogén monoxid rendszer inaktiválásában és ezáltal az inzulin rezisztencia kialakulásában szerepet játszó tényezők

### DOHÁNYFÜST

- VII. Vizsgálataink szerint a dohányfüst csökkenti az endothel sejtek nitrogén monoxid termelését.
- VIII. A dohányfüstnek az endothel sejtek nitrogén monoxid termelését csökkentő hatása glutationnal kivédhető.
- IX. A dohányfüst jelentős mennyiségű formaldehidet tartalmaz, amely nagy aktivitással csökkenti a redukált glutation mennyiségét.
- X. Natív poliakrilamid gél elektroforézis vizsgálatokkal igazoltuk thrombocyták fehérjeinek dohányfüstre bekövetkező átstrukturálódását.

### HYPOXIA

- XI. Vizsgálataink szerint az inzulin rezisztenciával járó hypoxia és pseudohypoxia (amely pl. hyperglycaemiában lép fel) modelljében a glukóz-6-foszfátáz enzim aktivitása csökken.
- XII. A hypoxia és a pseudohypoxia modelljében lipid peroxidáció és hidroxil szabad gyök termelés okozza a glukóz-6-foszfátáz enzim gátlását.

XIII. A hypoxia modellünkben a különböző vas komplexek szabad gyökök termelődését segítik elő: a vas-ATP komplex a lipíd peroxidációnak, a vas-EDTA komplex a hidroxil szabad gyök termelődésnek kedvez.

#### AZ ARGININNEK, A NITROGÉN MONOXID SZINTÁZ ENZIM SZUBSZTRÁTJÁNAK GLUKÓZ (HYPERGLYCAEMIA) HATÁSÁRA LÉTREJÖVŐ VÁLTOZÁSAI (NEM-ENZIMATIKUS GLIKÁCIÓ MODELL)

XIV. Vizsgálataink szerint elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópia alkalmazásával igazolható, hogy az arginin és a glukóz reakcióba lép egymással.

XV. ESR vizsgálatokkal igazoltuk, az arginin + glukóz reakció hőmérséklet függését is.

XVI. Az ESR spektrumok alapján az arginin + glukóz reakcióban pirazil és/vagy pirimidinil szabad gyökök keletkeznek.

XVII. Az ESR módszer érzéketlensége miatt az arginin + glukóz reakció testhőmérsékleten nem detektálható.

XVIII. Az arginin + glukóz reakciót a vas elsősorban a vas redukált, ferro állapota ( $Fe^{2+}$ ) katalizálja.

XIX. Vizsgálataink alapján az arginin + glukóz reakcióhoz szükséges elektron mind az argininből, mind pedig a glukózból származhat. Ennek igazolására új módszert dolgoztunk ki ferrozin felhasználásával.

XX. Spin trapping ESR módszer alkalmazásával igazoltuk, hogy az arginin hidroxil szabad gyököt kelt, amelynek képződése a vasat komplexáló desferrioxaminnal gátolható.

XXI. Igazoltuk a guanidino csoport jelentőségét az arginin kiváltotta hidroxil szabad gyök képződésben.

XXII. Igazoltuk, hogy a glukóz hidroxil gyök jelenlétében glukóz szabad gyökké alakul, ami feltehetően az aktív forma az aminosavak és fehérjék glukóz által okozott módosításában.



## 8. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

## Közlemények

- 1, I.WITTMANN, A.PUPPI, M.DELY, Relationship between the tissue redox state potential and  $dK/dt$  changes of K activity during k-strophanthoside or acetylcholine induced contractures Acta Physiol.Hung. 1982:60:233-236.
- 2, A.PUPPI, I.WITTMANN, M.DELY, Redox state potential influences dNa activity values during acetylcholine contractures of frog skeletal muscles Gen.Pharmacol. 1982:13:321-325.
- 3, A.PUPPI, I.WITTMANN, M.DELY, Inverse modulation of extracellular Na- and K-activities by ascorbate or methylene blue Gen. Physiol. Biophys. 1986:5:187-192.
- 4, A. HOFFMANN-TRAEGER, G.PEIKER, R.GLOECKNER, I.WITTMANN, A.BALOGH, L.HENSCHHEL, The influence of phenobarbital on the pharmacokinetics of propranolol in pregnancy Biological Research in Pregnancy and Perinatology 1987:8:57-59.
- 5, I.WITTMANN, A.PUPPI, M.DELY, Changes in autorhythmic heart frequency elicited by redox agents Chem.-Biol. Interactions 1987:63:115-125.
- 6, I.WITTMANN, T.PAST, ZS.TAPSONYI, T.HORVÁTH, T.JÁVOR, In vitro model for measurement of free radical effects: effect of PMS/phenazine methosulfate/ on red blood cell membrane Acta Physiol. Hung. 1989:73:341-345.

7. T.PAST, I.WITTMANN, J.BELÁGYI, T.JÁVOR, Effect of ion milled to the free radicals generated by phenazine methosulfate /PMS/ Acta Physiol.Hung. 1989:73:347-349.
8. T.JÁVOR, T.PAST, L.NAGY, GY.MÓZSIK, I.WITTMANN, Free radicals and their interpretations Acta. Physiol.Hung. 1989:73:323-330.
9. A.PUPPI, I.WITTMANN, M.DELY, Redox agents modulate a  $K^+$  changes evoked by acetylcholine and adrenaline in frog heart Acta Physiol.Hung. 1990:76:1/61-69.
10. I.WITTMANN, T.PAST. ZS.TAPSONYI, J.BELÁGYI, T.JÁVOR, Indirect and direct evidences for three type effect of the phenazine methosulfate on erythrocytes Pharmacol.Res. 1992:Suppl.2:183.
11. B. HUNYADY, CS. HORVÁTH, I. WITTMANN, Hisztamin H2-receptor blokkoló kezeléste nem reagáló fekélybeteg esete. Magyar Belorvosi Arch. 1994:47(4)301-304.
12. J.NAGY, M.MOLNÁR, I.WITTMANN, Microalbuminuria jelentősége a diabéteses nephropathia korai diagnózisában és kezelésében. Diabetologia Hungarica 1996:1:5-11.
13. I.WITTMANN, M.MOLNÁR, J.NAGY, A felnőttkori diabéteszes nefropátia kezelése. Diabetologia Hungarica 1996(Suppl.II)103-104.
14. I.WITTMANN, J.NAGY, Are insulin resistance and atherosclerosis the consequences of oxidative stress? Diabetologia 1996:39:1002-1003.

- 15, I. WITTMANN, J. NAGY, Effectiveness of phosphorus supplementation in glucose intolerant hypophosphatemic patients. Mineral. Electrol. Metab. 1997;23:62-63.
- 16, I. WITTMANN, I. MAZÁK, L. WAGNER, J. NAGY, Possible role of free radicals generated by pseudohypoxia in the regulation of hepatic glucose output. An in vitro model using rat liver microsomal glucose 6-phosphatase. Diabetologia 1997;40:1251-1254.
- 17, J. NAGY, EG. DeMASTER, I. WITTMANN, P. SCHULTZ, L. RAJJ, Induction of endothelial cell injury by cigarette smoke. Endothelium 1997;5:251-263.
- 18, M. MOLNÁR, I. WITTMANN, I. MÓD, Á. VÖRÖS, J. NAGY, A diabeteses nephropathia előfordulása, stádiumai és rizikó tényezői NIDDM-ben. Magyar Belorvosi Archivum 1998;51:66-72.
- 19, J. NAGY, I. WITTMANN, L. WAGNER, EG. DeMASTER, P. SHULTZ, L. RAJJ, A cigarettafüstben lévő szabadgyökök okozta endothelsejt károsodás. Magyar Belorvosi Archivum 1998;51:43-49.
- 20, I. WITTMANN, L. WAGNER, J. KÁTAL, G. KASSAI, I. MAZÁK, J. NAGY. Az inzulin gátló hatása thrombocyták ATP szekréciójára. Magyar Belorvosi Archivum 1998;51:61-65.

**Könyvfejezetek:**

1. T.JÁVOR, T.HORVÁTH, I. WITTMANN, S.NAGY, J.DELY, E.BALOGH, I.KÁDAS, The free radical evoked capacity of hepatotoxic agents /ethanol and carbone tetrachloride/ oxidized by microsomal cytochrome system and the protective effect on these damages by scavengers in Cytochrome P-450 Biochemistry Biophysics and Induction Eds. L.Vereczkei and K.Magyar, Akadémia Kiadó, Budapest, 1985:67-70.
2. A.PÁR, T.HORVÁTH, T. BERÓ, I.KÁDAS, F.PAKODI, I.WITTMANN AND T.JÁVOR, Effect of cyanidanol /Catergen/ on hepatic drug biotransformation and elimination in patients with chronic alcoholism and cirrhosis in Cytochrom P-450 Biochemistry Biophysics and Induction Eds. L.Vereczkei and K.Magyar, Akadémia Kiadó, Budapest, 1985:311-314
3. T. PAST, I. WITTMANN, Á. NAGY, T. HORVÁTH, L.SZABÓ, É.SZABÓ, T. JÁVOR. Heavy metal ions and free radicals. Oxygen Free radicals and Scavengers in the Natural Sciences Eds: Gy. Mózsik, I. Emerit, J.Fehér, B.Matkovics, Á.Vincze, Akadémia Kiadó, Budapest, 1993, pp.105-108.

## Abstractok

1. K. TÓTH, L. WITTMANN, T. PAST, T. JÁVOR AND I. JURICKAY, Increase of red blood cell suspension viscosity caused by free radical generator Biorheology 1989;26:643.
2. L. WITTMANN, A. I. CEDERBAUM AND T. PAST, Effect of free radicals on the glucose transport of microsomal glucose-6-phosphatase in rat liver Diabetologia 1993;36:Suppl.1.:A152
3. L. WITTMANN, S. KESZTHELYI, L. CZOPF, J. NEMES, GY. MÓZSIK, The inverse relation between serum phosphate and blood glucose in glucose intolerant patients Z.Gastroenterol. 1994;32:308
4. L. WITTMANN, J. KÁTAI, M. MOLNÁR, J. NAGY, The possible role of nitric oxide in the effect of insulin on the aggregation and adenosine triphosphate release of human platelets. Diabetologia 1996;39(Suppl.1):A139
5. L. WITTMANN, J. KÁTAI, M. MOLNÁR, J. NAGY, The role of inhibition by insulin of aggregation and ATP release of platelets in the prevention of diabetic nephropathy; evidence supporting nitric oxide mediation of the insulin effect on platelet functions. Nephrol Dial Transplant 1996;11:A120
6. L. WAGNER, I. WITTMANN, T. KŐSZEGI, J. KÁTAI, J. NAGY, The possible role of hyperinsulinemia in the development of diabetic nephropathy. Nephrology 1997;3:(Suppl. 1) S259

- 7, I. WITTMANN, T. KŐSZEGLI, J. KÁTAI, L. WAGNER, M. Molnár, J. NAGY, Insulin induced nitric oxide and superoxide free radical production of human platelets. Diabetologia 1997;40:(Suppl.1) A144
- 8, M. MOLNÁR, I. WITTMANN, Á. VÖRÖS, J. NAGY, Characteristics of diabetic nephropathy in NIDDM patients. Diabetologia 1997;40:(Suppl.1) A528
- 9, I. WITTMANN, J. BELÁGYI, L. PÓTÓ, Z. WAGNER, J. NAGY, Iron catalyzes glycation of L-arginine. Nephrol Dial Transplant 1998: Accepted
- 10, L. WAGNER, I. WITTMANN, J. KÁTAI, B. MELEGH, J. NAGY, The effect of cigarette smoke on the protein components of endothelial cells. Nephrol Dial Transplant 1998: Accepted
- 11, J. KÁTAI, I. WITTMANN, L. WAGNER, B. MELEGH, J. NAGY, Protein degradation in platelets caused by cigarette smoke. Nephrol Dial Transplant 1998: Accepted
- 12, I. WITTMANN, J. BELÁGYI, L. PÓTÓ, Z. WAGNER, J. NAGY, Glycation of L-arginine is catalyzed by iron and is resulted in free radical production. Diabetologia 1998, Accepted.

## IRODALOM

- 1, Foster DW: Insulin resistance - a secret killer? *N Engl J M* 1989;**320**:733-734.
- 2, DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;**14**:286-300.
- 3, Erickson J, Taimela S, Koivisto VA: Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia* 1997;**40**:125-135.
- 4, Zimmet PZ, McCarty DJ, de Courten MP: The global epidemiology of NIDDM and metabolic syndrome. *J Diab Comp* 1997;**11**:60-68.
- 5, Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;**37**:1595-1607.
- 6, Zimmet P: NIDDM (type 2) diabetes mellitus-Does it really exist? *Diabetic Med* 1989;**6**:728-738.
- 7, Kaplan NM: The daedly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989;**149**:1514-1520.
- 8, Zimmet P: Challenges in diabetes epidemiology - From West to the rest. *Diabetes Care* 1992;**15**:232-252.
- 9, Nathan DM, Meigs J, Singer DE: The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is ...or is it? *Lancet* 1997;**350**(**Suppl I**):4-9.
- 10, Kilaru P, Bakris GL: Renal mortality associated with NIDDM. *J Diab Comp* 1997;**11**:104-111.
- 11, Gamba V, Mecca G, Remuzzi G, Bertani T: Heterogeneous nature of renal lesions in type II diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1993;**3**:1458-1466.
- 12, Fioretto P, Mauer M, Brocco E et al.: Heterogeneity in renal structure in non-proteinuric NIDDM patients. *Diabetologia* 1995;**38**(**Suppl I**)A217 (Abstract)
- 13, Haffner S, Valdez R, Hazuda H, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP: Prospective analysis of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1992;**41**:715-722.
- 14 Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M: Hyperinsulinemic microalbuminuria. A new risk indicator for coronary heart disease. *Circulation* 1995;**91**:831-837.

- 15, Goodfellow J: Microvascular heart disease in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997;**40**:S130-S133.
- 16, The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group: Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int* 1995;**47**:1703-1720.
- 17, Frati AC, Iniestra F, Ariza CR: Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 1996;**19**:112-118.
- 18, Cutler RG: Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 1991;**53**:373S-379S.
- 19, Cutler RG: Antioxidants, aging, and longevity. In Pryor E, ed. *Free radicals in biology*. Vol VI. New York: Academic Press, 1984:371-428.
- 20, Hooper C: Free radicals: Research on biochemical bad boys comes of age. *J NIH Res* 1989;**1**:101-106.
- 21, Freeman BA, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;**47**:412-426.
- 22, Halliwell R, Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;**219**:10-14.
- 23, Crane FL, Sun IL, Clark MG, Grebing C, Löw H: Transplasma-membrane redox system in growth and development. *Biochim Biophys Acta* 1985;**811**:233-264.
- 24, Aruoma O: Eat, drink and be healthy. *Chem Brit* 1996;**32**:29-31.
- 25, Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Michel BR, Rosen H: Oxygen-based free radical generation by ferrous ions and deferoxamine. *J Biol Chem* 1989;**33**:19765-19771.
- 26, Ilan YA, Czapski G, Meisel D: The one-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen, superoxide system. *Biochim Biophys Acta* 1976;**430**:209-224.
- 27, Southorn PA, Powis G: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;**63**:381-389.
- 28, Slater TF: Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *Br J Cancer* 1987;**55**:(Suppl VIII)5-10.
- 29, Harman LS, Mottley C, Mason RP: Free radical metabolites of L-cystein oxidation. *J Biol Chem* 1984;**259**:5606-5611.
- 30, Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;**266**:4244-4250.



- 31, Gutteridge JMC, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 1990;**15**:129-135.
- 32, Archer S: Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993;**7**:349-360.
- 33, Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;**120**:227-237.
- 34, Stamler JS: Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;**78**:931-936.
- 35, Puntarulo S, Cederbaum AI: Inhibition of ferritin-stimulated microsomal production of reactive oxygen intermediates by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997;**340**:19-26.
- 36, Stamler JS: Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;**78**:931-936.
- 37, Tsuchiya K, Takasugi M, Minakuchi K, Fukuzawa K: Sensitive quantitation of nitric oxide by EPR spectroscopy. *Free Radical Biol Med* 1996;**21**:733-737.
- 38, Tomera JF: Nitric oxide: the interrelation of its actions. *Drugs of Today* 1994;**30**:611-621.
- 39, Ducrocq HY, Drapier C, Servent J, Pellat C, Guissani A: Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 1991;**20**:1-15.
- 40, Crow JP, Beckman JS: Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Advances in Pharmacology* 1995;**34**:17-43.
- 41, Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;**343**:1199-1206.
- 42, Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA, Cornwell TL: cGMP signalling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Advances in Pharmacology* 1995;**34**:305-322.
- 43, Lincoln TM, Cornwell TL: Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993;**7**:328-338.
- 44, Henry Y, Lepoivre M, Drapier J-L, Ducrocq C, Buochoer J-L, Guissani A: EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993;**7**:1124-1134.
- 45, Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL: Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995;**38**:4343-4362.

- 46, Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR, Simmons RL: Nitric oxide- A new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993;**55**:1205-1212.
- 47, Freeman BA, White CR, Gutierrez H, Paler-Martinez A, Tarpey MM, Rubbo H: Oxygen radical-nitric oxide reactions in vascular disease. *Advances in Pharmacology* 1995;**34**:45-69.
- 48, Fridovich I: Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;**23**:239-257.
- 49, Huie RE, Padmaja S: The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res Commun* 1993;**18**:195-199.
- 50, Dean TR: Free radicals, membrane damage and cell-mediated cytotoxicity. *Br J Cancer* 1987;**55**(Suppl. VIII)39-45.
- 51, Moan J: The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem Photobiol* 1984;**39**:445-449.
- 52, Ryan TP, Aust SD: The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol* 1992;**22**:119-141.
- 53, Juckett MB, Weber M, Balla J, Jacob HS, Vercelotti M: Nitric oxide donors modulate ferritin and protect endothelium from oxidative injury. *Free Radical Biol Med* 1996;**20**:63-73.
- 54, Galey J-B: Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Advances in Pharmacology* 1997;**38**:167-203.
- 55, Puntarulo S, Cederbaum AI: Ferritin dependent inactivation of microsomal glucose-6-phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1994;**1200**:41-47.
- 56, Okayama N, Kevil CG, Correia L et al.: Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 1997;**273**(Cell Physiol **42**)C1581-C1587.
- 57, Yue DK, McLennan S, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Ross GR, Turtle JR: Ascorbic acid metabolism and the polyol pathway in diabetes. *Diabetes*. 1989;**38**:257-261.
- 58, Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B: Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes*. 1991;**40**:1241-1244.

- 59, Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y: Glycation, oxidative stress and scavenger activity. Glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes*. 1996;**45**:(Suppl. III)S84-S86.
- 60, MacRury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, Rumley AG, MacCuish AC: A comparison of different methods of assessing free radicals activity in type 2 diabetes and peripheral vascular disease. *Diabetic Med*. 1993;**10**:331-335.
- 61, Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation: glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J*. 1988;**256**:205-212.
- 62, Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;**40**:405-412.
- 63, Tesfamariam B: Diabetes and vascular disease: function alterations in adrenergic neurotransmission and endothelium. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1995;**4**:92-97.
- 64, Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP: Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*. 1990;**39**:1420-1424.
- 65, Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Van Den Enden M, Kilo C, Tilton RG: Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 1993;**42**:801-813.
- 66, Wolff SP: Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the etiology of diabetes mellitus and complications. *Brit Med Bull*. 1993;**49**:642-652.
- 67, Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;**40**:405-412.
- 68, Tesfamariam B: Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radical Biol Med*. 1994;**16**:383-391.
- 69, Chisolm GM, Irwin KC, Penn MS: Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes*. 1992;**41**(Suppl II.)61-66.

- 70, Kashihara N, Watanabe Y, Makino H, Wallner EI, Kanwar YS: Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;**89**:6309-6313.
- 71, Balla G, Verceletti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS: Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest* 1991;**64**:648-655.
- 72, Halliwell B, Gutteridge JMC: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990;**280**:1-8.
- 73, Grootveld M, Halliwell B: Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free radical reactions in vivo? *Biochem J* 1987;**243**:803-808.
- 74, Ozhogina OA, Kasaikina OT:  $\beta$ -carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radical Biol Med* 1995;**19**:575-581.
- 75, Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res Commun* 1989;**6**:67-75.
- 76, Halliwell B: How to characterize a biological antioxidant? *Free Radical Res Commun* 1990;**9**:1-31.
- 77, Svardal AM, Mansoor MA, Ueland PM: Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography. *Anal Biochem* 1990;**184**:338-346.
- 78, Nuttall SL, Martin U, Sinclair AJ, Kendall MJ: Glutathione: in sickness and in health. *Lancet* 1998;**351**:645-646.
- 79, Karlsson K, Marklund SL: Plasma clearance of human extracellular superoxide dismutase in rabbits. *J Clin Invest* 1988;**82**:762-766.
- 80, Pascoe GA, Reed DJ: Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radical Biol Med* 1989;**6**:209-224.

- 81, Schraufstaetter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG: Glutathione cycle activity and pyridine nucleotide levels in oxidant-induced injury of cells. *J Clin Invest* 1985;**76**:1131-1139.
- 82, Oberley TD, Schultz JL, Li N, Oberley LW: Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol Med* 1995;**19**:53-65.
- 83, Starke PE, Farber JL: Endogenous defense against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1985;**260**:86-92.
- 84, Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**193**:265-275.
- 85, Nash T: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction *Biochem* 1953;**55**:416-421.
- 86, Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F: Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:10480-10484.
- 87, LeBel D, Poirier GG, Beaudoin AR: A convenient method for the ATPase assay. *Anal Biochem* 1978;**85**:86-89.
- 88, Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK: Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biol Med* 1996;**20**:251-256.
- 89, Floyd RA, Lewis CA: Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes. *Biochemistry* 1983;**22**:2645-2649.
- 90, Sautiel AR: Diverse signal pathways in the cellular actions of insulin. *Am J Physiol* 1996;**270**(*Endocrinol Metab* 33)E375-E385.
- 91, White MF, Kahn CR: The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994;**269**:1-4.
- 92, Tóth B, Bollen M, Stalmans W: Acute regulation of hepatic protein phosphatases by glucagon, insulin and glucose. *J Biol Chem* 1988;**263**:14061-14066.
- 93, Hess SL, Suchin CR, Saltiel AR: The specific protein phosphatase inhibitor okadaic acid differentially modulates insulin action. *J Cell Biochem* 1991;**45**:374-380.

- 94, Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD: Insulin mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994;**94**:1172-1179.
- 95, Schreer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P: Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994;**94**:2511-2515.
- 96, Wu H, Jeng YY, Yue C, Chyu KY, Hsueh W, Chan T: Endothelial-dependent vascular effects of insulin and insulin-like growth factor I in the perfused rat mesenteric artery and aortic ring. *Diabetes* 1994;**43**:1027-1032.
- 97, Lembo G, Iaccarino G, Vecchione C, Rendina V, Trimarco B. Insulin modulation of vascular reactivity is already impaired in prehypertensive SHR. *Hypertension* 1995;**26**:290-293.
- 98, Gross R, Borkowski KR, Feldman RD: Human insulin-mediated enhancement of vascular  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Hypertension* 1994;**23**:551-555.
- 99, Sowers JR: Effects of insulin and IGF-I on vascular smooth muscle glucose and cation metabolism. *Diabetes* 1996;**45**:47-51.
- 100, Han SZ, Ouchi Y, Karaki H, Orimo H: Inhibitory effects of insulin on cytosolic  $Ca^{2+}$  level and contraction in the rat aorta: endothelium dependent and independent mechanism. *Circ Res* 1995;**77**:673-678.
- 101, Kahn AM, Song T: Effects of insulin on vascular smooth muscle contraction. In: Sowers JR, ed. *Endocrinology of the Vasculature*. Totowa, NJ: Humana Press: 1996:**215**-223.
- 102, Standley PR, Zhang F, Ram JL, Zemel MB, Sowers JR: Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transient and voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;**88**:1230-1236.
- 103, Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, Song T: Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1993;**22**:735-742.
- 104, Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Song T: Insulin inhibits serotonin-induced calcium influx in vascular smooth muscle. *Circulation* 1994;**90**:384-390.

- 105, Han S-Z, Ouchi Y, Karaki H, Orimo H: Inhibitory effect of insulin on cytosolic calcium level and contraction in the rat aorta: endothelium dependent and independent mechanisms. *Circ Res* 1995;**77**:673-678.
- 106, Levi E, Fadda G, Ozbasli C, Massry SG: Evolution of metabolic and functional derangements of pancreatic islet in phosphate depletion. *Endocrinology* 1992;**131**:2182-2188.
- 107, Wittmann I, Nagy J: Effectiveness of phosphate supplementation in glucose intolerant, hypophosphatemic patients. *Miner Electrolyte Metab* 1997;**23**:62-63.
- 108, Lincoln TM, Cornwell TL: Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993;**7**:328-338.
- 109, Reuter H: Sodium-calcium exchange: ins and outs of calcium transport. *Nature* 1991;**349**:567-568.
- 110, Sowers JR: Effects of insulin and IGF-1 on vascular smooth muscle glucose and cation metabolism. *Diabetes* 1996;**45**:47-51.
- 111, Hundal HS, Marette A, Mitumoto Y, Ramlal T, Blostein R, Klip A: Insulin induces translocation of the  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  subunits of the  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  from the intracellular compartments to the plasma membranes in mammalian skeletal muscle *J Biol Chem* 1992;**267**:5040-5043.
- 112, Simmons WW, Closs EI, Cunningham JM, Smith TW, Kelly RA: Cytokine and insulin-induced cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes regulation of L-arginine transport and NO production by CAT-1, CAT-2 and CAT-2b. *J Biol Chem* 1996;**271**:11694-11702.
- 113, Wolin MS, Cherry PD, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G: Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to acetylcholine and nitric oxide via the extracellular generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;**254**:872-876.
- 114, Marczin N, Ryan US, Catravas JD: Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and EDRF-induced cGMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;**263**:170-179.
- 115, Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Piretto V, Cavalot F, Mularoni E, Anfossi G: The insulin-induced increase of cGMP in human platelets is mediated by nitric oxide. *Diabetes* 1996;**45**:768-770.

- 116, Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Mularoni EM, Hahn AW, Anfossi G: Studies on the influence of insulin on cAMP in human vascular smooth muscle cells: dependence on cGMP and modulation modulation of catecholamine effects. *Diabetologia* 1996;**39**:1156-1164.
- 117, Trovati M, Anfossi G, Cavalot F, Massucco P, Mularoni E, Emanuelli G: Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents: studies in vitro and in vivo. *Diabetes* 1988;**37**:780-786.
- 118, Charo IF, Feinman RD, Detweiler TC: Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 1977;**60**:866-873.
- 119, Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;**43**:109-142.
- 120, Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Mularoni E, Cavalot F, Anfossi G: Insulin increases guanosine-3',5'-cyclic monophosphate in human platelets. A mechanism involved in the insulin anti-aggregating effect. *Diabetes*. 1994;**43**:1015-1019.
- 121, Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M: Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Anal Chem* 1993;**65**:1794-1799.
- 122, Catz SD, Carreras MC, Poderoso JJ: Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radical Biol Med* 1995;**19**:741-748.
- 123, Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM, et al.: Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995;**77**:510-518.
- 124, Xia Y, Zweier JL: Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:12705-12710.
- 125, Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992;**281**:627-630.
- 126, Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL: Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:6770-6774.



127. Arnal J-F, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG: Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J Clin Invest* 1995;**95**:2565-2572.
128. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:8612-8616.
129. Venema R, Sayegh H, Kent J, Harrison D: Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial cell and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 1996;**271**:6435-6440.
130. Chowieńczyk P, Ritter J: Arginine: NO more than a simple aminoacid? *Lancet* 1997;**350**:901-902.
131. Chen L, Salafranca MN, Mehta JH: Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997;**273**:H1854-1859.
132. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P: Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995;**125**:370-377.
133. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: Characterization of the L-arginine-nitric oxide pathway in human platelets. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990;**101**:325-328
134. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:5193-5197.
135. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P: Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995;**125**:370-377.
136. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T: Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:22810-22814.
137. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RGW, Michel T: Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996;**271**:6518-6522.

- 138, Crane FL, Sun IL, Clark MG, Grebing C, Löw H: Transplasma-membrane redox system in growth and development. *Biochim Biophys Acta* 1985;**811**:233-264.
- 139, Dormandy TL, Zarday Z: The mechanism of insulin action: the immediate electrochemical effects of insulin on red-cell systems. *J Physiol* 1965;180:684-707.
- 140, Sun IL, Crane FL, Löw H, Grebing C: Transplasma membrane redox stimulates HeLa cell growth. *Biochim Biophys Res Comm* 1984;125:649-654.
- 141, Sase K, Michel T: Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med* 1997;7:25-34.
- 142, Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F: Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:10480-10484.
- 143, Michel T, Feron O: Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;**100**:2146-2152.
- 144, Couet J, Li S, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP: Molecular and cellular biology of caveolae. *Trends Cardiovasc Med* 1997;**4**:103-110.
- 145, Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly EA: Dynamic targeting of the agonist-stimulated muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997;**272**:17744-17748.
- 146, deWeerd WFC, Leeb-Lundberg LMF: Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G $\alpha$  subunits G $\alpha_q$  and G $\alpha_i$  in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997;**272**:17858-17866.
- 147, Schnitzer JE: The endothelial cell surface and caveolae in health and disease. In *Vascular endothelium physiology, pathology, and therapeutic opportunities*. Eds. Born GVR and Schwartz CJ, Schattaer, Stuttgart, New York, 1997;77-95.
- 148, Ma L, Chow JYC, Cho CH: Mechanistic study of adverse actions of cigarette smoke exposure on acetic acid-induced gastric ulceration in rats. *Life Sciences* 1998;**62**:257-266.

- 149, Reznick AZ, Han D, Packer L: Cigarette smoke induced oxidation of human plasma proteins, lipids and antioxidants: selective protection by biothiols dihydrolipoic acid and glutathione. *Redox Report* 1997;**3**:169-174.
- 150, Elliott SJ, Koliwad SK: Oxidant stress and endothelial membrane transport. *Free Radical Biol Med* 1995;**19**:649-658.
- 151, Pryor WA, Church DF, Govandin CK, Crank G: Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: Synthetic utility and toxicological implications. *J Org Chem* 1982;**47**:156-159.
- 152, Lange R: Inhibiting effect of tobacco smoke on some crystalline enzymes. *Science* 1961;**134**:52-54.
- 153, Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, Zbinden J, Schlek E: SH reactivity of cigarette smoke and its correlation with carcinogenic effect on hamster lung cultures. Sozial- und Praeventivmedizin 1976;**21**:47-50.
- 154, Evans DJ, Hoskinson RM, Mayfield RJ: Enzyme inhibition by tobacco smoke: a comparison of the effect of four filters. *Arch Envir Health* 1979;**34**:103-106.
- 155, Wald C, Czaczkes W, Dikstein S: Effect of ethacrynic acid on the glutathione activated ATP-ases. 1972;**59**:1-2.
- 156, Mullins LJ: Ion transport in heart. Raven Press, New York, 1981
- 157, Ignarro LJ: Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin Hematol* 1989;**26**:63-76.
- 158, Church DF, Pryor WA: Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Envir Health Perspec* 1985;**64**:111-126.
- 159, Balla G, Vercelotti GM, Eaton JW, Jacob HS: Iron loading of endothelial cells augments damage by neutrophils and other oxidant systems: protection by hydrophobic lazaroids and vitamin E. *J Lab Clin Med* 1990;**116**:546-554.
- 160, Kosaka H, Uozumi M, Tyuma J: The interaction between nitrogen oxides and hemoglobin and endothelium-derived relaxing factor. *Free Radical Biol Med* 1989;**7**:653-658.

- 161, Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercelotti GM: Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: Induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:9285-9289.
- 162, Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercelotti GM: Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler and Thromb* 1991;**11**:1700-1711.
- 163, Kishimoto I, Garbers DL: Physiological regulation of blood pressure and kidney function by guanylyl cyclase isoforms. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 1997;**6**:58-63.
- 164, Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C: Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* 1991;**266**:12544-12547.
- 165, Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF: Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:7773-7777.
- 166, Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F: *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:10480-10484.
- 167, Ferrannini E, DeFronzo RA: Insulin actions in vivo: glucose metabolism. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P (eds) *International textbook of diabetes mellitus* Wiley, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 1992; pp 409-438.
- 168, Guignot L, Mithieux G: Hyperglycemia, but not hyperinsulinemia, inhibits liver glucose-6-phosphatase activity in rat. *Diabetologia* 1996;**39**:13, Abstract.
- 169, Robbins BL, Foster JD, Nordlie RC: Metabolic intermediates as potential regulators of glucose-6-phosphatase. *Life Sciences* 1991;**48**:1075-1081.
- 170, Williamson DH, Lund P, Krebs HA: The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 1967;**103**:514-526.
- 171, Yu BP: Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radical Biol Med* 1996;**21**:651-668.

- 172, Traverso N, Menini S, Cottalasso D, Odetti P, Marinari UM, Pronzato MA: Mutual interaction between glycation and oxidation during non-enzymatic protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1997;**1336**:409-418.
- 173, Jones AF, Lunec J: Protein fluorescence and its relationship to free radical activity. *Br J Cancer* 1987;**55(Suppl. VIII)**:60-65.
- 174, Lyons JT, Jenkins AJ: Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipid* 1997;**8**:174-180.
- 175, Liggins J, Furth AJ: Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochim Biophys Acta* 1997;**1361**:123-130.
- 176, Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF: Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982;**208**:129-140.
- 177, Spycher SE, Tabataba-Vakili S, O'Donnell VB, Palomba L, Azzi A: Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells. *FASEB J* 1997;**11**:181-188.
- 178, Gutteridge JM: Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett* 1981;**128**:343-346.
- 179, Baker JR, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW: Chemistry of the fructosamine assay: D-glucosone is the product of oxidation of Amadori compounds. *Clin Chem* 1994;**40**:1950-1955.
- 180, Glomb MA, Monnier VM: Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 1995;**270**:10017-10026.
- 181, Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW: Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;**34**:3702-3709
- 182, Zyzak DV, Richardson JM, Thorpe SR, Baynes JW: : Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions *Arch Biochem Biophys* 1995;**316**:547-554.
- 183, Rooney LW, Salem A, Johnson JA: Studies of the carbonyl compounds produced by sugar-amino acid reactions. I Model systems. 1967;**44**:539-550.

- 184, Hayase F, Shibuya T, Sato J, Yamamoto M: Effects of oxygen and transition metals on the advanced Maillard reaction of proteins with glucose. *Biosci Biotech Biochem* 1996;**60**:1820-1825.
- 185, Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, Niwa T, Lemke H-D, Schinzel R: Determination of advanced glycation end-products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;**35**:669-677.
- 186, Nakamura K, Hasegawa T, Fukunaga Y, Ienaga K: Crossline A and B as candidates for the fluorophores in age- and diabetes-related cross-linked proteins, and their diacetates produced by Maillard reaction of N-acetyl-lisine with glucose. *J Chem Soc Chem Commun* 1992;**14**:992-994.
- 187, Ienaga K, Nakamura K, Hoshi T et al.: Crosslines. Fluorophores in the AGE-related proteins. *Contrib Nephrol* 1995;**112**:42-51.
- 188, Nakamura K, Nakazawa Y, Ienaga K: Acid-stable fluorescent advanced glycation end-products: vesperlysine A, B and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**232**:227-230.
- 189, Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW: Identification of N-(carboxymethyl)lysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986;**261**:4889-4994.
- 190, Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR et al: Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;**91**:2463-2469.
- 191, Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Baynes JW: Structural characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and hippuryllysine. *J Org Chem* 1995;**60**:6246-6247.
- 192, Wells-Knecht K, Brinkmann E, Wells-Knecht MC et al: New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol Dial Transplant* 1996;**11**(Suppl. V):41-47.
- 193, Liggins J, Furth AJ: Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochim Biophys Acta* 1997;**1361**:123-130.
- 194, Schwartz JG: The role of glycohaemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Rev* 1995;**3**:269-287.
- 195, Jain SK, Palmer M: The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radical Biol Med* 1997;**22**:593-596.

- 196, Witztum JL, Steinbrecher UP, Kesaniemi A et al: Autoantibodies to glycosylated proteins in the plasma of patients with diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;**81**:3204-3208.
- 197, Vlassara H: Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complication. *Diabetes* 1997;**46**:(Suppl II)S19-S25.
- 198, Westwood ME, Argirov OK, Abordo EA, Thornalley PJ: Methylglyoxal-modified arginine residues- a signal for receptor-mediated endocytosis and degradation of proteins by monocytic THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997;**1356**:84-94.
- 199, Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H: Modification of LDL by advanced glycosylation endproducts contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:9441-9445.
- 200, Bierhaus A, Chevion S, Chevion M et al.: Advanced glycation end product-induced activation of NF- $\kappa$ B is suppressed by  $\alpha$ -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997;**46**:1481-1490.
- 201, Pugliese G, Pricci F, Romeo G et al.: Upregulation of mesangial growth factor and extracellular matrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism. *Diabetes* 1997;**46**:1881-1887.
- 202, Chappey O, Dosquet C, Wautier M-P, Wautier J-L: Advanced glycation end products, oxidative stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997;**27**:97-108.
- 203, Koschinsky T, He C-J, Mitsuhashi T et al.: Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:6474-6479.
- 204, Hogan M, Cerami A, Bucala R: Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;**90**:1110-1115.
- 205, Jain SK, Palmer M: The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radical Biol Med* 1997;**22**:593-596.
- 206, Galey J-B: Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Advances in Pharmacology* 1997;**38**:167-203.

- 207, Lovaas E: Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Advances in Pharmacology* 1997;**38**:119-149.
- 208, Miller DM, Buettner GR, Aust SD: Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radical Biol Med* 1990;**8**:95-108.
- 209, Hayashi T, Ohta Y, Namiki M: Electron spin resonance spectral study on the structure of the novel free radical products formed by the reactions of sugars with amino acids or amines. *J Agric Food Chem* 1977;**25**:1282-1287.
- 210, Giugliano D, Ceriello A: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;**19**:257-267.
- 211, Marfella R, Verrazzo G, Acampora R et al.: Glutathione reverses systemic hemodynamic changes induced by acute hyperglycemia in healthy subjects. *Am J Physiol* 1995;**268**(**Endocrinol Metab** 31):E1167-E1173.
- 212, Ceriello A, Motz E, Cavarape A et al.: Hyperglycemia counterbalances the antihypertensive effect of glutathione in diabetic patients: Evidence linking hypertension and glycemia through the oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diab Comp* 1997;**11**:250-255.
- 213, Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E et al.: Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997;**20**:194-197.
- 214, Ceriello A, Bortolotti N, Pirisi M et al.: Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997;**20**:1589-1593.
- 215, Leoncini G, Signorello MG, Piana A, Carrubba M, Armani U: Hyperactivity and increased hydrogen peroxide formation in platelets of NIDDM patients. *Thromosis Res* 1997;**86**:153-160.
- 216, Lubec B, Hayn M, Kitzmüller E, Vierthapper H, Lubec G: L-arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus *Free Radical Biol Med* 1997;**22**:355-357.
- 217, Facchini FS, Hollenbeck CB, Jeppesen J, Chen Y-DI, Reaven GM: Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet* 1992;**339**:1128-1130
- 218, Attvall S, Fowelin J, Lager I, von Schenk H, Smith U: Smoking induces insulin resistance: potential link with the insulin resistance syndrome. *J Int Med* 1993;**233**:327-332.



- 219, Rönnemaa T, Rönnemaa EM, Puukaa P, Pyörala K, Laakso M: Smoking is independently associated with high plasma insulin levels in nondiabetic men. *Diabetes Care* 1996;**18**:1229-1232.
- 220, Salahudeen AK, Kanji V, Reckelhoff JF, Schmidt AM: Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach. *Nephrol Dial Transplant* 1997;**12**:664-668.
- 221, Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC: Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;**328**:1450-1456.
- 222, Kushi LH, Folsom AR, Princeas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM: Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;**334**:1156-1162.
- 223, Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ: Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the established populations for epidemiologic studies of the elderly. *Am J Clin Nutr* 1996;**64**:190-196.
- 224, Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC: A prospective study of vitamin E consumption and risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;**328**:1444-1449.