

**AZ L-ARGININ - NITROGÉN MONOXID RENDSZER
SZEREPE A
VESEBETEGSÉGEK PROGRESSZIÓJÁBAN**

Doktori (PhD) - értekezés

Dr. Wagner László

II.sz. Belgyógyászati Klinika
és Nephrologiai Centrum

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2002

A Doktori Iskola vezetője, program- és témavezető:

Prof. Dr. Nagy Judit

	Oldal
TARTALOMJEGYZÉK	2
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. ÖSSZEFOGLALÁS	8
SUMMARY	9
3. BEVEZETÉS	10
3.1. Az <i>L</i>-arginin metabolizmus lehetséges útvonalai	11
3.1.1. Az <i>L</i> -arginin élettani szerepe	11
3.1.2. Az <i>L</i> -arginin szerepe a növekedésben és a táplálkozásban	11
3.1.3. Az <i>L</i> -arginin szintézise	12
3.1.4. Az <i>L</i> -arginin transzportja	13
3.1.5. Az <i>L</i> -arginin metabolizmusa	14
3.1.5.0. A nitrogén monoxid út	14
3.1.5.1. Az urea szintézise és az L-ornitin metabolizmusa	14
3.1.5.2. Kreatin-szintézis	15
3.1.5.3. Az agmatin út	16
3.1.5.4. Protein-szintézis	17
3.1.5.5. Az <i>L</i> -arginin metilált formái	17
3.1.6. Az <i>L</i> -arginin egyéb hatásai	18
3.1.7. Az <i>L</i> -arginin kiválasztása a vesén keresztül	18
3.1.8. Összefoglalás	18
3.2. A nitrogén monoxid élettana és kórélettana	19
3.2.1. Az <i>NO</i> termelődése	19
3.2.2. A <i>NOS</i> izomerek lokalizációja a vesében	19
3.2.3. Az <i>L</i> -arginin paradox	20
3.2.4. Az <i>NO</i> termelődését befolyásoló egyéb tényezők	20
3.2.5. <i>NO</i> termelés – nem szokványos módon	20
3.2.6. Az <i>NO</i> oldékonysága és transzportja	21
3.2.7. Az <i>NO</i> molekuláris reakciói	21
3.2.7.1. A GC enzim aktiválása	22
3.2.7.2. Oxidációs végtermékek keletkezése: NO _x	22
3.2.7.3. Reakció szuperoxid anion szabad gyökkel és nitroziláció	22
3.2.8. Az <i>NO</i> fiziológias szerepe általánosságban	23
3.2.9. Az <i>NO</i> fiziológias szerepe a vesében	24
3.2.10. Az endotél diszfunkció celluláris és molekuláris mechanizmusai	24
3.2.11. Az <i>NO</i> patofiziológias szerepe és a vesebetegségek	24
3.2.12. Összefoglalás	26
4. CÉLKITŰZÉSEK	27
5. MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK	28

5.1. <i>Endotélsejtek intakt L-arginin - nitrogén monoxid rendszere in vitro</i>	28
5.1.1. Módszerek	28
5.1.2. Eredmények	32
5.1.3. Összefoglalás	33
5.2. <i>Az L-arginin – nitrogén monoxid rendszert befolyásoló néhány faktor in vitro vizsgálata</i>	34
5.2.1. <i>A dohányfüst hatása az NO-cGMP útvonalra: cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben</i>	34
5.2.1.1. Módszerek	34
5.2.1.2. Eredmények	35
5.2.1.3. Összefoglalás	36
5.2.2. <i>A dohányzás hatása az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételére</i>	36
5.2.2.1. Módszerek	36
5.2.2.2. Eredmények	37
5.2.2.3. Összefoglalás	38
5.2.3. <i>A trombociták szabad gyök termelése hiperinzulinaemiában</i>	38
5.2.3.1. Módszerek	38
5.2.3.2. Eredmények	39
5.2.3.3. Összefoglalás	40
5.2.4. <i>Az L-arginin nem enzimatisz glikációja</i>	40
5.2.4.1. Módszerek	41
5.2.4.2. Eredmények	41
5.2.4.3. Összefoglalás	41
5.2.5. <i>Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatása endotélsejtekre</i>	42
5.2.5.1. Módszerek	42
5.2.5.2. Eredmények	44
5.2.5.3. Összefoglalás	46
5.2.6. <i>Az urea hatása endotélsejtek L-arginin transzportjára és a nitrogén monoxid szintetáz aktivitására in vitro</i>	46
5.2.6.1. Módszerek	47
5.2.6.2. Eredmények	48
5.2.6.3. Összefoglalás	50
5.3. <i>Az L-arginin – nitrogén monoxid útvonal in vivo vizsgálata állatokban - az urea hatása</i>	50
5.3.1. Módszerek	51
5.3.2. Eredmények	55
5.3.3. Összefoglalás	56

	Oldal
5.4. Humán vizsgálatok - IgA nefropátia és hipertónia	56
5.4.1. <i>Endoteliális vasoactiv anyagok; a dohányzás hatása</i>	58
5.4.1.1. Módszerek	59
5.4.1.2. Eredmények	59
5.4.1.3. Összefoglalás	60
5.4.2. <i>Ambuláns vérnyomásmonitorozás</i>	60
5.4.2.1. Módszerek	61
5.4.2.2. Eredmények	61
5.4.2.3. Összefoglalás	62
5.4.3. <i>Terápia</i>	62
5.4.3.1. Módszerek	62
5.4.3.2. Eredmények	63
5.4.3.3. Összefoglalás	63
6. MEGBESZÉLÉS	64
6.1. <i>Endotélsejtek intakt L-arginin - nitrogén monoxid rendszere in vitro</i>	64
6.2. <i>A dohányfüst hatása az NO-cGMP útvonalra: cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben</i>	65
6.3. <i>A dohányzás hatása az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételére</i>	67
6.4. <i>Szabad gyök-termelés hiperinzulinémiában trombocitákban</i>	68
6.5. <i>Az L-arginin nem enzimatis glikációja</i>	69
6.6. <i>Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatása endotélsejtekre</i>	73
6.7. <i>Az urea hatása endotélsejtek L-arginin transzportjára és a nitrogén monoxid szintetáz aktivitására in vitro</i>	75
6.8. <i>Az L-arginin – nitrogén monoxid útvonal in vivo vizsgálata állatokban - az urea hatása</i>	78
6.9. <i>Humán vizsgálatok - IgA nefropátia és hipertónia</i>	80
6.9.1. <i>Endoteliális vasoactiv anyagok; a dohányzás hatása</i>	80
6.9.2. <i>Ambuláns vérnyomásmonitorozás</i>	81
6.9.3. <i>Terápia</i>	82

	Oldal
7. EGY LEHETSÉGES JÖVŐKÉP - Az L-arginin adásának és megszorításának hatása egészséges és beteg vesére	83
7.1. L-arginin és normál vese	83
7.1.1. L-arginin adagolás és megvonás hatása normál vesére	83
7.1.2. L-arg antagonisták hatása normál vesére	83
7.2. L-arginin és vesebetegség	84
7.2.1. Vesebetegség és L-arg hiány	84
7.2.2. L-arg adagolás / restriktio és vesebetegség	86
7.2.2.1. Állatkísérletek	86
7.2.2.2. Humán vizsgálatok	89
7.2.3. Az L-arg adagolással kapcsolatos egyéb eredmények	91
7.3. Összefoglalás	91
8. ZÁRSZÓ	93
9. TÉZISEK - ÚJ EREDMÉNYEK	94
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
11. IRODALOMJEGYZÉK	98
12. A SZERZŐ ÉRTEKEZÉSEL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓI	111
12.1. <i>Közlemények</i>	111
12.2. <i>Kongresszusi összefoglalók</i>	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABPM - 24 órás vérnyomásmonitorozás (ambulatory blood pressure monitoring)
ACE - angiotenzin konvertáz enzim
ADK - arginin dekarboxiláz
ADMA- aszimmetrikus dimetil-arginin
AGAT - arginin-glicin amidinotranszferáz
AL - argininoszukcinát liáz
AS - argininoszukcinát szintetáz
AtS - arginil-tRNS szintetáz
ATSZ - anti-timocita szérum
AUC - area under curve (görbe alatti terület)
BAT - széles spektrumú aminosav transzporter (broad spectrum aminoacid transporter)
BH₄ - tetrahydrobiopterin
BHT - butilált hidroxitoluén
BTAEC - marha thoracalis aorta endotélsejtek (bovine thoracic aortic endothelial cells)
CaM - calmodulin
CAT1 - kationos aminosav transzporter (cationic aminoacid transporter)
CCB - kalcium csatorna blokkoló (Ca channel blocker)
cGMP - ciklikus guanozin monofoszfát
DAO - diaminoxidáz
DDAH - dimetilarginin dimetilaminohidroláz
DMEM - Dulbecco modifikált Eagle médiuma
EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav
EGF - endothelial growth factor
ESR - elektron spin rezonancia
ET - endothelin
FAD - flavin-adenin dinukleotid
FBS - főtális marhaszérum (fetal bovine serum)
FF - filtrációs frakció
FMN - flavin-mononukleotid
GFR - glomeruláris filtrációs ráta
HBSS - Hank-féle sóoldat (Hank's balanced salt solution)
HD - hemodialízis
HDMVEC - humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejtek
HGEC - humán glomeruláris endotélsejtek
HPLC - nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia (high performance liquid chromatogr.)
IgA NP - IgA nefropátia
IL - interleukin
K_f - glomeruláris ultrafiltrációs koefficiens
K_m - az enzim maximális aktivitásának feléhez szükséges szubsztrátkoncentráció
KVB - krónikus vesebetegség
L-arg - L-arginin
L-cit - L-citrullin

L-gln - L-glutamin
 L-glu - L-glutaminsav
 L-NAME - N^o-nitro-L-arginin metilészter
 L-NMA - N^G-monometil-L-arginin
 L-NNA - N- ω -nitro-L-arginin
 L-orn - L-ornitin
 L-pro - L-prolin
 LPS - lipopoliszacharid
 MEM - minimális esszenciális médium
 NADP - nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
 NO - nitrogén monoxid
 NOHA - N^G-hydroxy-L-arginin
 NOS - nitrogén monoxid szintetáz (e - endoteliális, i - indukálható, n - neuronális izoforma)
 NO_x - nitrit/nitrát (NO₂⁻/NO₃⁻)
 NS - nem szignifikáns
 OAT - ornitin aminotranszferáz
 ODK - ornitin dekarboxiláz
 OTK - ornitin transzkarbamiláz
 ONNO⁻ - szuperoxid anion
 PAEC - sertés aorta endotélisejt (porcine aortic endothelial cells)
 PBS - foszfát pufferolt fiziológiás sóoldat (phosphate buffered saline)
 PD - peritoneális dialízis
 PDGF - platelet derived growth factor
 PRMT - protein-arginin metiltranszferáz
 P5C - pirrolin-5-karboxilát
 RMAEC - patkány mezenterikus arterioláris endotélisejt (rat mesent. arteriol. endoth. cell)
 RMVEC - patkány mezenterikus venuláris endotélisejt (rat mesent. venular endoth. cell)
 RPF - renális plazma áramlás
 RR - vérnyomás
 RVR - renális vaszkuláris rezisztencia
 SDMA - szimmetrikus dimetil-arginin
 SDS - Na dodecil szulfát (sodium dodecil sulfat)
 SB - dohányfüst puffer (smoking buffer)
 SE - standard error
 TBS - Tris pufferolt fiziológiás sóoldat (Tris buffered saline)
 TBS-T - TBS Tween 20 detergenssel kiegészítve
 TGF- β - transforming growth factor β
 U_{Na}V - vizelettel ürített nátrium ürítés
 U_{NO_x}V - vizelettel történt nitrit- és nitrátürítés
 VVE - végstádiumú veseelégtelenség

Megjegyzés: A fejezetek címe mögött zárójelben olvashatók a fejezethez kapcsolódó **tézisek (fekete, római számmal)** és **saját publikációk (piros, arab számmal)**.

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Nagy populációkat érintő kóros állapotokban és modelljeikben (dohányzás, diabetes mellitus, hipertónia, IgA nefropátia, veseelégtelenség) kutattuk az L-arginin – nitrogén monoxid rendszer változását, és ennek lehetséges hatásait a vesebetegség progressziójára, a terápiás befolyásolhatóság reményében.

A mikrocirkulációból származó endotélium intakt L-arginin – nitrogén monoxid rendszerének vizsgálata során kiderítettük, hogy a venuláris oldal alap nitrogén monoxid-termelő képessége nagyobb az arteriolárisénál.

Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a dohányzás csökkenti az endotélium nitrogén monoxid-termelését (mely folyamat glutationnal kivédhető); megváltoztatja az endotélisejtek fehérjeösszetételét. Továbbá megfigyeltük, hogy a dohányzás kapcsán a szervezetbe kerülő jelentős mennyiségű nitrogén oxidok miatt a vizelettel ürített nitrit- és nitrát-mennyiségéből nem következtethetünk a szervezet nitrogén monoxid termelésére, ami egyébként – a vizelettel ürített cGMP-mennyiséghez hasonlóan – használható erre a célra.

A cukorbetegség kóros metabolizmusának modelljeiben láttuk, hogy a hiperinzulinémia fokozott szuperoxid anion- és nitrogén monoxid- és következményesen nagy mennyiségű peroxinitrit-termelődéssel jár; illetve, hogy a magas glükóz-szint glikálhatja az L-arginint, ami pl. a nitrogén monoxid-szintetáz szubsztrát-hozzáférhetőségét csökkentheti.

A krónikus vesebetegségben szenvedő betegek plazmája és ennek bizonyos komponensei (pl. ADMA, urea), csökkenthetik az endotélisejtek L-arginin-transzportját és nitrogén monoxid szintetáz aktivitását in vitro; azonban, az ureának önmagában, nagy koncentrációban, jó vesefunkció mellett nincs ilyen hatása.

A hipertónia - melynek kialakulásában szerepet játszhat a csökkent nitrogén monoxid-termelés – előállapotaiban szenvedő IgA nefropátiás betegek (non-dipper egyének, illetve fehérvérny hipertóniások) gyorsabb vesefunkció-romlást mutattak, mint a dipper normotensív egyének. A 24-órás ambuláns vérnyomásmérésre alapozott gyógykezeléssel illetve hosszabb hatástartamú ACE-gátló és Ca-csatorna blokkoló általában együttes adásával jobban csökkenthető a magas vérnyomás ezekben a betegekben.

Felmerül az L-arginin exogén adásának jótékony hatása bizonyos vesebetegségekben, így krónikus vesebetegségben is, azonban a sok ellentmondásos eredmény miatt ahhoz, hogy az L-arginin bekerülhessen a terápiás fegyvertárba, még további kutatásokra van szükség.

SUMMARY

The goal of this dissertation was to do research on some diseases, pathological conditions and their models affecting large populations (such as smoking, diabetes mellitus, hypertension, IgA nephropathy, renal insufficiency), whether they influence the L-arginine – nitric oxide system and the progression of kidney diseases.

According to our studies with intact microcirculatory endothelial cells, nitric oxide producing capacity of the venular side is better than that of the the arteriolar endotélium.

On the basis of our results, smoking decreases nitric oxide production of the endothelium (this can be prevented by the addition of glutathione). Cigarette smoke also alters the protein composition of endothelial cells. In addition, different nitric oxides inhaled during smoking increase the excreted amount of nitrite and nitrate in the urine, making it impossible to use these values for the estimation of the total nitric oxide producing capacity of the body.

Some models of altered diabetic metabolism showed, that hyperinsulinaemia increases superoxide, nitric oxide, and consequent peroxynitrite production. Furthermore, glucose in high levels may glycate L-arginine, leading e.g. to diminished substrate availability for the nitric oxide synthase enzyme.

The plasma and some components (e.g. ADMA, urea) from patients suffering from chronic renal insufficiency may decrease the L-arginine-transport and the nitric oxide synthetase activity of endothelial cells in vitro. However, urea by itself, in uremic concentration, by intact kidney function has no such effect.

Decreased nitric oxide production may play a role in the development of hypertension. IgA nephropathy patients showing precedent conditions of hypertension (non-dippers, patients with white coat hypertension) had a more progressive kidney function loss, than dippers with normotension. Therapy based on the automated ambulatory blood pressure measurements, and the use of long-acting ACE- and Ca-channel blockers help to reduce high blood pressure better in these patients.

The exogenous administration of L-arginine may have beneficial effects in some renal diseases (e.g. in chronic renal disease). However, because of controversaries in findings, a lot of research is needed until L-arginine can be acknowledged as a therapeutic agent.

3. BEVEZETÉS

A vesebetegségek egy része krónikussá válhat, a krónikus vesebetegségek (KVB) egy hányada végstádiumú veseelégtelenséghez (VVE) vezethet. Bizonyos vesebetegségekben a progresszió gyakori (pl. krónikus glomerulonephritis, diabeteses nefropátia, reflux nefropátia, kétoldali policisztás vesebetegség esetén), míg más esetekben ritka és általában lassú a betegség romlásának folyamata (pl. nephrosclerosis benigna, analgeticum nefropátia). Ugyanazon vesebetegségben azonban nem mindig van progresszió, és a vesebetegség típusa sem kizárólagosan határozza meg a progressziót: a vesefunkció romlásának üteme egyénenként is változik, melyet valószínűleg több faktor befolyásol.

A vesebetegség progressziójának ismert rizikófaktorai az eredeti vesebetegség tartós aktivitása, a veleszületett vagy szerzett nagyfokú veseszövet-hiány, a glomeruláris átáramlást és intraglomeruláris nyomást fokozó hemodinamikai tényezők (nagy mennyiségű fehérjét tartalmazó diéta, diabetes mellitus, hiperlipidémia), perzisztáló és nefrotikus határt elérő/meghaladó proteinuria, nem kontrollált magas vérnyomás, infekciók, húgyuti obstrukció, reflux, nephrotoxinok, kalcium vagy urát lerakódása, stb.

Sok adat utal arra, hogy a fent felsorolt faktorok okozta károsodás patomechanizmusában (pl. hemodinamikai tényezők, magas vérnyomás, stb.) többször szerepet játszik az L-arginin (L-arg) – nitrogén monoxid (NO) – ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) rendszer zavart működése. Erre jó példa az egyik legjobban vizsgált modell, az 5/6-od nefrektómiás patkány modell (emberi megfelelője az előrehaladt veseszövet-pusztulással járó kórképek), ahol a progressziót főként hemodinamikai változások okozzák. Itt a maradék nephronokban az arteriola afferens rezisztenciája jobban csökken (nagy valószínűséggel NO hiány miatt), mint az arteriola efferens rezisztenciája, így fokozódik a glomeruláris kapilláris nyomás, ami növeli a glomeruláris vérátáramlást, majd növekszik az egyes nephronokra jutó glomeruláris filtrációs ráta (GFR) is, hiperfiltráció alakul ki, ami glomeruláris hipertrófiához vezet. Mivel a hiperfiltrációval nem tart lépést a filtráló felület növekedése (sőt utóbbi gyakran csökken is), károsodnak az endotél-, a mezangiális- és epiteliális sejtek: mikrotrombusok, hialinózis, mesangium-expansió és mikroaneurizmák kialakulásán és képződésén keresztül glomerulosclerosisoz vezetnek az elváltozások. A glomeruláris károsodások mellett tubulointersticiális károsodások is létrejönnek, melyek hozzájárulhatnak a progresszióhoz.

Az állatkísérletes modellek mellett a következő emberi vesebetegségekben állhatnak hemodinamikai tényezők a progresszió mögött: a működő nephronok számának csökkenése (féloldali vese agenézia, féloldali nefrektómia, parenchimás vesebetegségek előrehaladott

stádiuma), a primer vesevazodilatáció állapotai (diabetes mellitus, sarlósejtes anémia), hipertónia - kezeletlen vagy rosszul kezelt és/vagy csökkent autoregulációval.

Munkámban igyekeztem összefoglalni az L-arg - NO rendszer már ismert sajátosságait (a hatalmas mennyiségű rendelkezésre álló információ miatt a teljesség igénye nélkül). Az in vitro, és in vivo kísérleteinkben, valamint humán megfigyeléseink kapcsán próbáltunk az L-arg - NO rendszer további részleteire, összefüggéseire fényt deríteni, az esetlegesen felmerülő új terápiás lehetőségek reményében. Tettük ezt azért, mivel a vesebetegségek nagy része ma még alig vagy egyáltalán nem gyógyítható, azonban progressziójuk jelentősen befolyásolható, aminek kapcsán akár évekkel-évtizedekkel toltatható ki a szükségessé váló művesekezelés, illetve lassítható az egész szervezetet érintő tulajdonképpeni öregedési és elhasználódási folyamat.

3.1. Az L-arg metabolizmus lehetséges útvonalai (publikáció 15)

3.1.1. Az L-arg élettani szerepe

L-arg-re nemcsak a fehérjék szintéziséhez van szükség, de jelentős szerepe van az urea, kreatin(in), NO, agmatin, poliaminok, glutaminsav (L-glu), illetve a prolin (L-pro) termelődésében is. Ezeken az anyagokon keresztül szerepe van a nitrogén-egyensúly fenntartásában (fehérjelebomlási termékek eliminációja, izomanyagcsere), az értónus szabályozásában, a trombociták és fehérvérsejtek kitapadásának befolyásolásában, az immunrendszer szabályozásában, a neurotranszmisszióban, az RNS-szintézisben és következményesen a sejt- és szövetnövekedésben és sejt differenciálódásban, a kollagén-szintézisben, de növeli a spermiumok számát és mobilitását, emeli a tímusz limfocitaszámát, segíti a tumor felismerést és a szervezet tumorok elleni válaszát is (217, 248, 314).

3.1.2. Az L-arg szerepe a növekedésben és a táplálkozásban

Az L-arg-t sokáig nem esszenciális aminosavnak tekintették, kiderült viszont, hogy bizonyos állapotokban, illetve betegségekben nélkülözhetlenné válhat. Kifejlett egyedekben az L-arg szemi-esszenciális aminosav, míg a növekedés során, a megnövekedett igény miatt esszenciális. Forrásai egyrészt exogének: diétás bevitel, napi 1-5 g, ennek kb. 30-44%-a kerül az ileumból és a jejunumból a splanchnicus keringésbe, a maradék kb. 56-70% a bélhámsejtek által katabolizálódik, illetve a széklettel távozik, másrészt endogének: szintézis a vesében és a májban. A normál diéta kb. 1-3%-át és a teljes fehérjebevitel kb. 5-6%-át alkotja az L-arg (58, 217, 228, 248). Megemlíteném, hogy magas

hőmérsékleten az L-arg-t és glükózt tartalmazó oldatokban (ételek hőkezelése) szabad gyökök, előrehaladott glikációs produktumok keletkezhetnek, melyeket sikerült kimutatni elektronspin-rezonancia technikával. Ezek a táplálékkal a szervezetbe jutva különböző módon károsíthatják a szöveteket. Csökkent vesefunkció esetén, kiválasztódásuk lassulása miatt fokozott jelentőségük lehet (300). Az említett produktumok testhőmérsékleten is keletkezhetnek: metilglioxál és L-arg (illetve L-arg helyett L-ornitin /L-orn/, L-citrullin /L-cit/, L-alanin, N⁰-nitro-L-arginin metilészter /L-NAME/) reakciója során, lúgos közegben (192 = 31, 309 = 8).

3.1.3. Az L-arg szintézise

Az L-arg szintézis fő helye a vese (kb. 60%). A májban is jelentős L-arg termelés folyik, de az ott jelenlévő nagy fokú argináz-hatás miatt az L-arg nagy része metabolizálódik és így nem kerül a keringésbe. Kismértékű L-arg szintézis az endotélsejtekben és makrofágokban is folyik. (228, 248, 314). Az L-arg becsült in vivo, de novo szintézise kb. 16 $\mu\text{mol/kg/h}$, mely konstans (58). Az endogén eredetű L-arg az összes keringő L-arg-nak mindössze 5-15%-át teszi ki. Az endogén eredetű, keringő L-arg nagy részét a teljestest fehérje metabolizmusa határozza meg (314).

a. Vese

A vese a vékonybélből a keringésbe jutott L-cit kb. 83%-át veszi fel a proximális tubulusokon keresztül, majd az argininoszukcinát szintetáz (AS) segítségével L-aszpartát beépítésével argininoszukcinátot képez, melyet az argininoszukcinát liáz (AL) alakít át L-arg-ná (fumarát termelődése mellett; arginin-citrullin ciklus, vagy citrullin-NO ciklus), ami szinte teljes mennyiségben a keringésbe jut (159, 204, 248), mivel a vesében az argináz aktivitás elkülönül az L-arg bioszintézis fő helyétől (172). Az AS és AL enzimek nagy mennyiségben találhatóak a vesében és a májban, de több más szerv és sokféle sejt is expresszálja (203). A vese L-arg szintézisének mértéke lényegében az L-cit kínálattól függ. Az L-cit fő forrása a vékonybél, ahol az izom aminosav-katabolizmusból származó L-glutamint (L-gln) és a felszívódott L-gln és L-glu alakul át L-cit-ná így az L-arg szintézis nagyrésze a "vékonybél-vese tengely" működés eredménye (248, 314).

b. Máj

A máj a keringésből az L-cit kevesebb, mint 0,25%-át veszi fel, mivel saját teljes, nagyon intenzíven működő urea-ciklussal rendelkezik (az argináz-aktivitás kb. 50-100-szor

nagyobb a májban, mint a vesében; 248).

c. Endotélsejtek

Az endotélsejtek is újrahasznosítják a NOS enzim termelte L-cit-t, azt ismét L-arginá alakítva (AS és AL enzimek segítségével), illetve fehérjékből valószínűleg peptidil-L-argineket is felszabadítanak (116, 314), illetve exogén L-cit-t is felhasználnak az L-argin szintéziséhez (312). Az L-gln gátolja az L-argin szintézist: egyrészt az L-cit felvételének kompetitív gátlása révén, másrészt az AS aktivitás blokkolásával (268, 312, 314).

d. Makrofágok

Az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) enzim indukciójával együtt az AS enzim is indukálódik a makrofágokban (de minden nem-hepatikus eredetű sejtben is), így az iNOS megnövekedett szubsztrátigényét az L-cit újrahasznosításával elégíti ki. A sejtenyészetben kapott eredmények ellenére (mind endotélsejtekben, mind makrofágokban) az L-argin újrahasznosításának szerepe az in vivo NO termelődésben még nem tisztázott (203, 314).

3.1.4. Az L-argin transzportja

Az L-argin transzportját különböző transzporter rendszerek végzik (y^+ , $b^{0,+}$, $B^{0,+}$, y^+L), melyek közül az y^+ rendszer kationos aminosavakra szelektív, míg a többi neutrális aminosavakat is transzportál. Az y^+ rendszer nátriumtól független, és az L-argin felvétele szempontjából a legjelentősebb (az L-orn és L-lizin felvételét is mediálja). Újabban bizonyos transzmembrán fehérjéket fedeztek fel (CAT-1, CAT-2A, CAT-2/B/ és CAT-3; kationos aminosavtranszporterek), melyek aminosav transzporter tulajdonságai megegyeztek az y^+ rendszerével, de nem tisztázott, hogy utóbbi tartalmaz-e más molekulákat is az előbb említetteken kívül, mindenesetre annyi bizonyos, hogy az y^+ rendszer a CAT transzporterek működésének expressziója. Emellett kimutattak úgynevezett BAT fehérjéket is (rBAT és 4F2hc, széles spektrumú transzport fehérjék, broad spectrum aminoacid transporter), melyek valószínűleg transzport-regulátorok (77). A vesében kimutatták a CAT-1 (ubikviteren fordul elő) mRNS-ét is. Más kationos aminosavak és pozitív töltésű analógok gátolják az y^+ rendszer működését (L-orn, L-lizin, N^G -monometil-L-arginin /L-NMA/, N^G -iminoetil-L-ornitin; 314).

Az urea nagy (urémiásokban előforduló) koncentrációban csökkenti az endotélsejtekbe történő L-argin transzportot (lásd az ureánál).

3.1.5. Az *L-arg* metabolizmusa

Az *L-arg* anyagcserét foglalja össze az 1. ábra. Az 1. és 2. táblázat a fontosabb metabolitok normál értékeit mutatja be a plazmában és a vizeletben.

Az enzimatis reakciók közül meghatározóak az argininoszukcinát szintetáz, a két argináz, a három nitrogén monoxid szintetáz és az arginin dekarboxiláz katalizálta folyamatok. Az argininoszukcinát szintetáz, az arginázok, a nitrogén monoxid szintetáz enzimek és a kationos aminosavtranszporter aktivitásának jelentős hatása van az *L-arg* anyagcseréjére egészséges egyéneknél és vesebetegségekben. Komplex interakciók jellemzik ezen enzimek működését, melyek közül egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az arginázok szabályozó hatásának az NO, poliaminok, *L-pro* és *L-glu* szintézisében. Tovább bonyolítja a képet a különböző enzimek mind szervspecifikus (pl. máj, vékonybél, vese), mind szubcelluláris kompartmentalizációja, illetve az enzimek expressziójának változása a diétás, hormonális és citokin behatásokra (314).

3.1.5.0. Az NO út

Az NO az *L-arg* talán legfontosabb metabolitja. Részletes leírását a 3.2. fejezet ismerteti.

3.1.5.1. Az urea szintézise és az *L-orn* metabolizmusa

Az argináz *L-arg*-ból *L-orn*-t és ureát hasít, majd az *L-orn*-t alakítja tovább az ornitin dekarboxiláz (ODK, poliamin-szintézis) segítségével, illetve az ornitin aminotranszferáz (OAT, *L-pro* szintézis, *L-glu* szintézis). A poliaminoknak a sejtproliferációban, az *L-pro*-nak a kollagén-szintézisben van szerepe, míg az *L-glu* (az *L-gln*-nal) a tejben leggyakrabban előforduló aminosavak, illetve utóbbiak prekursorai a GABA-szintézisnek (γ -aminobutirát), mely fontos ingerületátvivő anyag. Az urea a vesefunkciónak, a diétás protein-bevitelnek és a hidráltási állapotnak a markere.

Az argináznak két izomere van. Az argináz I, citoszolikus enzim, nagy mennyiségben fordul elő a májban az urea-ciklus részeként, míg az argináz II mitokondriális lokalizációjú, és kisebb mértékben előfordul a vesében, az agyban, a vékonybélben, az emlőmirigyben és a makrofágokban (314). Mindkét izomert kimutatták endotélsejtekben: a konstitutív forma (argináz I) lipopoliszacharid (LPS) hatása nélkül is jelen van, míg az argináz II megjelenését az LPS indukálja (57). Bár az urea szintézisének legnagyobb része a májban történik, a felszívódó *L-arg* 40%-át argináz hasítja a vékonybél

mukózában (314). Mivel az extrahepatikus szervek nem rendelkeznek teljes urea-ciklussal, így az argináz II szerepe még nem tisztázott (57).

Öröklött hepatikus argináz defektus esetén kimutatták az argináz II emelkedett expresszióját vesében (314). Mind az argináz, mind a NOS aktivitása jelentősen gyengébb diabeteses patkányok endotélsejtjeiben (313).

a.) A poliamin út

Az L-orn további metabolizmusában fontos szerep jut az ODK-nak, a poliamin-szintézis kulcsenzimének, mely a vesében, a vékonybélben és más szervekben is megtalálható.

A poliaminok (putreszcin, spermin, spermidin) nélkülözhetetlenek a sejtproliferációhoz és a differenciációhoz. A vese argináz aktivitása stimulálja a poliamin-szintézist, ugyanis az ODK működését az L-orn kínálat határozza meg (228, 314).

b.) Az L-pro és L-gln út

Az OAT enzim L-orn-ből pirrolin-5-karboxilátot (P5C) termel, mely tovább alakulhat L-pro-ná (P5C reduktáz segítségével), illetve L-glu-vá (P5C dehidrogenáz aktivitás révén). Az L-pro a kollagénszintézishez szükséges (a kollagén kb. 22%-a L-pro), az L-glu és L-gln a tej leggyakoribb aminosavai (228, 314).

Megjegyzés: Az ornitin transzkarbamiláz enzim (OTK) az L-orn-t L-cit-ná alakítja, karbamil-foszfát (melyet a karbamil-foszfát szintetáz termel ammóniából és széndioxidból, ATP segítségével) beépítésével. Az OTK-t humán illetve patkány vesében nem írták le, csak májban, illetve vékonybél epiteliális sejtekben (203), kimutatták viszont csirke vesében (291).

3.1.5.2. Kreatin-szintézis

A kreatin bioszintézisének első lépését az arginin-glicin amidinotranszferáz (AGAT) katalizálja, másnéven transzaminidáz enzim, mely a további biokémiai lépések szempontjából limitáló hatású enzim, és amely által katalizált reakció a vesekéreg proximális tubulusaiban játszódik le. Az L-glicinnel történő egyesülés révén az L-arg-ből az enzim guanidino ecetsavat hoz létre, mely a májban kreatinné metilálódik, majd a vázizomzatban alakul kreatininné (194, 248). A kreatinin szabadon oszlik el a teljестest víztartalmában, nagyrészt a vizelettel távozik, de tovább is metabolizálódhat, illetve kreatinné is visszaalakulhat. A kreatinin a leggyakrabban használt vesefunkciós marker

(248).

3.1.5.3. Az agmatin út

Az agmatint az arginin dekarboxiláz (ADK) enzim szintetizálja L-arg-ból, széndioxid keletkezése mellett. Az agmatint a diaminoxidáz (DAO), másnéven agmatináz enzim bontja tovább, agmatin aldehidet (guanidino-butilaldehidet) termelve. Az ADK enzim a vesében mind a kéregben, mind a velőben megtalálható, emellett az agyszövetben, a májban, a szívben, a lépben és a tüdőben, mitokondrium-dús sejtfrakciójában (179), illetve endotélsejtekben és az aorta membránfrakciójában is kimutatták jelenlétét (246). A DAO enzim a vesében elsősorban a kéregben, a glomerulusokban fordul elő, de az epidermiszben, a placentában, a vékonybél epitélisejtjeiben, az eozinofil fehérvérsejtekben, makrofágokban, illetve vénák, artériák, bronchiolusok, a gyomorfalban és a bőrben simaizom sejtjeiben is kimutatták (179).

Az agmatin (10 μM) stimulálja az endoteliális konstitutív NOS-t (eNOS, 205). Az agmatin néhány tíz μM -os koncentrációban a neuronális NOS-t (nNOS) irreverzibilisen inaktiválja (76), illetve 1-300 μM -os koncentrációban gátolja az iNOS-t is (1). Mások leírták az agmatin gyenge kompetitív antagonistá szerepét mindhárom NOS-izomeren (legjobban az iNOS-t gátolva), bár az agmatin az eNOS-t csak mM-os nagyságrendben blokkolta (99). Az agmatin aldehid is gátolja az iNOS-t. Az agmatin emellett, antizim-függő mechanizmuson keresztül blokkolja az ODK enzimet, illetve a sejtmembránban található poliamin transzportert (37).

Vese-intersticium és glomerulusok agmatinnal történt mikroperfúziója patkányban reverzibilisen emelte a GFR-t és az abszolút proximális reabszorpciót. Ezeket a hatásokat vese-denerváció nem befolyásolta (179). Az agmatin vazodilatációt és GFR emelkedést okoz a vesében, illetve sejtproliferációt gátló hatású (37).

Az agmatin stimulálja a katekolamin-szekréción mellékvesekéreg kromaffin sejtjeiből, patkány-ciszternába injektálva emeli a vérnyomást, serkenti az inzulinszekréción, stimulálja a hipotalamusz LHRH elválasztását, javítja a morfin-analgéziát és megelőzi a morfin-tolerancia kialakulását (99). Az agmatin kötődik az α_2 -adrenerg és imidazolin-2 receptorokhoz is, és szerepe lehet a vaszkuláris simaizomsejtjei növekedés gátlásában (246). Az agmatin tumor-szupresszor szerepét is kutatják (259).

Az agmatin *in vivo* szerepe még vitatott, de más L-arg anyagcsereútvonalakat befolyásolhat (228, 314). Újabban közölték az agmatin jótékony hatását experimentális anti-timocita glomerulonephritisben, ahol gátolta a sejtproliferáció kialakulását és javította

a vesefunkciót (130).

3.1.5.4. Protein-szintézis

Az L-arg - arginil-tRNS formájában – a fehérjeszintézis közvetlen prekursora. Jelentős szerepe van azonban a fehérjék lebomlásában is: a proteinek N-terminális szakaszán található aszpartáthoz vagy glutamáthoz poszt-transzlációban kapcsolódva segíti az ubikvitin-függő proteolitikus aktivitást (314).

3.1.5.5. Az L-arg metilált formái

Az L-NMA, az aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) és a szimmetrikus dimetil-arginin (SDMA) a protein-arginin metiltransferáz (PRMT) enzimek által szintetizált L-arg analógok, melyek a fehérjék L-arg-reziduumait metilálják. A PRMT-nek két izomerje van, a PRMT I a hiszton- és nonhiszton-fehérjékhez kapcsol metilcsoportot, míg a PRMT II specifikusan a mielin bázikus proteint metilálja. Előbbi L-NMA-t és ADMA-t, míg utóbbi L-NMA-t és SDMA-t termel. A metilált analógok fehérjelebontás során szabadulnak fel; a citoszolba, majd onnan a plazmába kerülnek. A dimetilargininok koncentrációja kb. tízszerese az L-NMA koncentrációjának (169, 293). Az L-NMA-t és az ADMA-t a dimetilarginin dimetilaminohidroláz enzim (DDAH) bontja, citrullint termelve. Az enzimnek két izomerje létezik, a DDAH I főleg az nNOS-t, míg a DDAH II az eNOS-t expresszáló szövetekben van jelen. Mindkettő főleg citoszolikus lokalizációjú enzim, és nagy mennyiségben fordul elő a vesében is (35, 148, 168).

Az ADMA és az L-NMA (míg az SDMA nem) kompetitíve gátolják a NOS enzimet: az L-NMA IC_{50} értéke mindhárom NOS izomeren 2-5 μ M-os nagyságrendű, az ADMA ekvipotens az L-NMA-val: 3-10 μ M-os koncentrációban gátolja az NO termelést L-arg jelenlétében izolált erekben, sejtenyészetben makrofágokban és endotélsejtekben. Mivel biológiai rendszerekben a sztöchiometriai arány nem 1:1, így többlet L-arg-ra van szükség az ADMA vagy L-NMA okozta gátlás kivédéséhez. Emellett mindhárom metilarginin, az L-arg-nel együtt az y^+ rendszeren keresztül jut a sejtbe (144, 169, 293). ADMA farmakológiai koncentrációban (100 μ M) kismértékben gátolja az L-arg transzportot endotélsejtekbe, míg nincs hatása erre abban a koncentrációban (2,5 μ M, 10 μ M), ami urémiában fordul elő (319).

ADMA adagolás intravénásan (1-30 mg/kg) dózisfüggő vérnyomásemelkedést okoz tengerimalacban, illetve lokális infúzióban (2-16 μ mol/min) csökkenti az alkari vérkeringést egészséges egyéneknél (293).

A metilargininek egészséges vese esetén a vizelettel választódnak ki (kb. 60 μmol / 24 h ADMA, a vizeletmennyiségtől függően akár 20 μM -os koncentrációt is elérhet) és metabolizálódnak, veseelégtelenségben viszont csökken a kiválasztásuk, és így szintjük megemelkedik a plazmában (0,5-10 μM), a veseelégtelenség fokával arányosan (93, 169, 188, 263). Hemodializáltakban jobban emelkedett az ADMA-szint, mint peritoneális dialízissel kezeltékben, bár a hemodialízis akutan jelentősen csökkentette a plazma koncentrációt (7, 8, 144, 186, 264, 265). Az SDMA szintje általában jobban emelkedik, valószínűleg azért, mert az ADMA-t metabolizálja a DDAH. Az emelkedett ADMA szint in vivo hatásai még nagyrészt ismeretlenek, de valószínűleg szerepe van a sóháztartás megváltoztatásában, az értónus és az erek reaktivitásának növelésében, a fokozott aterosclerosisban és az immunrendszer befolyásolásában (169), és endotél diszfunkciót okozó hatása miatt a vaszkuláris megbetegedések új rizikófaktora lehet (70).

3.1.6. Az L-arg egyéb hatásai

Az L-arg különböző hormonok (inzulin, katekolaminok, kortikoszteron, glukagon, növekedési hormon, prolaktin, szomatosztatin) elválasztásán keresztül is hat (248, 314). Különösen érdekes tanulmány foglalkozik az L-arg infúzió inzulinszekréciót okozó hatásával és következményes NO-szerű effektusával (104, lásd lejjebb). A növekedési hormon deficienciájának diagnosztikához tartozott évtizedekig a 30 g parenterális L-arg adagolás, mely stimulálja a növekedési hormon elválasztását (228).

3.1.7. Az L-arg kiválasztása a vesén keresztül

Az L-arg a glomerulusokon átszűrődik és majdnem teljes mennyiségben visszaszívódik a proximális tubulusokban (248). Az L-arg egészséges egyéneknél a vizeletben csak kis mennyiségben fordul elő (néhány tíz $\mu\text{mol/g}$ kreatinin), és sem fehérjementes diéta, sem L-arg-dús étrend nem változtatja meg jelentősen az L-arg kiválasztását (135).

3.1.8. Összefoglalás

Az L-arg szemi-esszenciális aminosav. A keringésbe kerülő L-arg termelődésének fő helye a vese proximális tubulusa. Az L-arg főként kationos aminosavként a segítségével jut a sejtekbe, ahol fiziológiásan sokféle módon metabolizálódhat: L-arg-ra nemcsak a fehérjék szintéziséhez van szükség, de jelentős szerepe van az urea, kreatinin, nitrogén monoxid, agmatin, poliaminok, L-glu, illetve a L-pro termelődésében is. Így részt

vesz a nitrogén-egyensúly fenntartásában, az értónus szabályozásában, a trombociták és fehérvérsejtek kitapadásának befolyásolásában, az immunrendszer szabályozásában, a neurotranszmisszióban, a sejt- és szövetnövekedésben és sejt differenciálódásban, a kollagén-szintézisben, de növeli a spermiumok számát és mobilitását, emeli a tímusz limfocitaszámát, segíti a tumor felismerést és a szervezet tumor elleni válaszát is. A metabolikus útvonalak megoszlása, az egyes útvonalak L-arg fogyasztásának mértéke, sőt a metabolitok és az egyes útvonalak interakciója különböző módon változhat mind szövet-, szervspecifikusan, mind bizonyos (vese)betegségekben a fiziológiás állapothoz képest.

3.2. Az NO élettana és kórélettana

3.2.1. Az NO termelődése

A nitrogén monoxid szintáz enzim (NOS) L-arg-ból nitrogén monoxidot és L-cit-t hasít, N^G-hydroxy-L-arginin (NOHA) intermedier keletkezésén keresztül, molekuláris oxigén jelenlétében, számos kofaktor (redukált nikotinamid adenin dinukleotid /NADPH/, tetrahydrobiopterin /BH₄/, citokróm P-450 típusú hem molekula, kalmodulin, flavinadenin dinukleotid /FAD/, flavin mononukleotid /FMN/) segítségével (52). A 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 endoteliális NOS (eNOS, működését szemlélteti a 2. ábra). A konstitutív enzim kalciummal aktiválható; stimulálható receptorhatáson keresztül, pl. bradikininnel, kalcium ionoforral, de ADP, szerotonin is stimulálja (10). Akut nyíróerő szintén aktiválja az eNOS-t (20). Számos inhibitor gátolhatja az eNOS működését: pl. L-NMA, ADMA. A konstitutív enzim mind citoszolikus (nNOS), mind membránokhoz kötött formája (eNOS, ami az endotélsejtekben és a trombocitákban fordul elő) ismert. A cNOS aktiválódása rövid időtartamú, pikomólos nagyságrendű NO termeléssel jár. Az iNOS általában kalcium independens, hosszan (órákig) tartó NO termelés jellemzi, nanomólos koncentrációban termel NO-t, és az enzim különböző indukciók hatására (lipopoliszacharid, citokinek: TNF-alfa, IL-1) expresszálódik, amit a glukokortikoidok gátolni képesek (10).

3.2.2. A NOS izomerek lokalizációja a vesében

A NOS mindhárom izomerje előfordul a vesében: [1] Az eNOS legfőképpen a vese érrendszer endotélsejtjeiben található, de kimutatták a proximális tubulusokban, a Henle-kacs felszálló vastag szárában a velőben és a gyűjtőcsatornában is. [2] Az nNOS előfordul a makula denzában, a glomeruláris parietális epitéliumban, a glomerularis efferens

arteriolák endotélsejtjeiben, a vesemedence idegeiben, a perivaszkuláris idegekben, a kérgi és velői gyűjtőcsatornáknban, a Henle-kacs velői vékony szárában. [3] Az iNOS megtalálható fiziológiásan a juxtaglomeruláris apparátusban, a proximális tubulusban, a Henle-kacs velői vastag felszálló szárában, a kérgi és velői gyűjtőcsatornáknban, az arteriae arcuatae-ban, a vasa recta kötegeiben és egyes adatok szerint a glomeruláris afferens arteriolákban (23, 154).

Az eNOS elsősorban a sejtek perinukleáris régiójában fordul elő, ami Golgi-markerekkel kimutatható, és kisebb, de szignifikáns mennyiségben a plazmamembrán kaveoláiban is jelen van (178). Immunohisztokémiailag kimutatták, hogy a CAT-1, az eNOS és a kaveolin kolokalizáltak fordulnak elő az endotélsejt plazmamembránjának kaveoláiban (kaveoláris komplexum), ami az extracelluláris L-arg eNOS-hoz történő eljuttatását segíti elő (kompartmentalizáció) (44, 193).

3.2.3. Az L-arg paradox

Itt kell megemlíteni az "arginin paradox" kifejezést, melyet annak a jelenségnek a leírására használnak, amikor az exogén L-arg adására a NOS aktiváció jön létre annak ellenére, hogy az L-arg már eleve feleslegben van jelen. Az intracelluláris L-arg koncentráció 100-1.000 μM az endotélsejtekben, míg az eNOS K_m -je kb. 3-5 μM , illetve az extracelluláris L-arg koncentrációt tekintve intakt sejteknél a K_m 73-150 μM , ami a plazma L-arg koncentrációjával megegyező tartományban van. A jelenség hátterében a kaveoláris komplexum (lásd lejjebb) állhat. (13, 193, 280, 314).

3.2.4. Az NO termelődését befolyásoló egyéb tényezők

Alacsony L-arg koncentrációnál az argináz és a NOS enzimek szubsztráthasználata hasonló mértékű, így az elegendő mennyiségű argináz korlátozhatja a NOS szubsztrát hozzáférhetőségét, mely jelenséget leírták sebgyógyulás esetén és makrofágokban (314). Szubszaturáló koncentrációjú L-arg vagy tetrahidrobiopterin (főleg az utóbbi) szuperoxid anion és hidrogén peroxid termelődéséhez vezet mindhárom NOS izomer esetében (191). További interakció a NOHA arginázt gátló hatása (57).

Leírták az eNOS és nNOS enzimek szubsztrát gátló hatását is in vitro, ennek mechanizmusa azonban ismeretlen (eNOS-nál feltételezik egy másodlagos kötőhely jelenlétét az L-arg számára), csakúgy mint in vivo jelentősége (280, 253).

3.2.5. NO termelés – nem szokványos módon

Megemlítendő, hogy az L-arg-ből nem-enzimatis módon is keletkezhethet NO. Az L-arg hidrogén peroxiddal reagálva NO termelődéshez vezethet, bár ehhez mindkét anyag magas koncentrációban kell, hogy jelen legyen (>10 mM), ami a NOS mikro környezetben, különösen például ateromatózus plakk környékén, citokin hatásra jöhet létre (65).

3.2.6. Az NO oldékonysága és transzportja

Az NO víz- és a zsírfázisban is előfordul, bár zsíroldékonysága jobb mint vízoldékonysága (az NO telített vizes oldata hozzávetőlegesen 3 mM-os; 11). Az NO a sejtek lipid kompartmentjében koncentrálódik, ami sokkal kisebb fázis a testben, mint a vizes fázis, ezért az NO nagyobb része található vízdoldott formában.

Lipofil tulajdonsága miatt tehát a plazmamembránon könnyen átjut. Mivel azonban nagyon reaktív, a humán plazmában nagyrészt S-nitrozó adduktumként "utazik", szabad NO nagyon kis mennyiségben van jelen (~3 nM). Az S-nitrozó adduktumokat S-nitrozótiolok (plazma koncentráció ~7 µM) alkotják, melyek 96%-a S-nitrozóprotein, ezek 82%-a S-nitrozóalbumin, melynek féléletideje sokkal hosszabb (több óra), mint az NO-é, így az S-nitrozóalbumin az NO rezervoárjaként funkcionál (277). Újabban kimutatták, hogy a vörösvérsejtek hemoglobin molekulája nemcsak az ismert oxidációs lépésre képes, melynek kapcsán NO_x keletkezik, hanem az NO molekula célzott transzportjára is, aminek során az NO-t a kevésbé oxigenizált régiókban adja le (kb. 1.000 hemoglobin molekulából 1), így segítve a lokális vérátáramlás növelését a vazodilatáción keresztül (108, 109, 224). Mások szerint hosszabb élettartamát az élő rendszerekben annak köszönheti, hogy tiol tartalmú molekulákhoz, elsősorban a glutation -SH csoportjához kötődik (276).

3.2.7. Az NO molekuláris reakciói

Az NO szabad gyök, mivel párosítatlan spinű elektronnal rendelkezik, így rendkívül reakcióképes, és emiatt rövid a féléletideje is ($T_{1/2} = 2-6$ másodperc; 180), azonban kis mennyiségben a kilélegzett levegőben is előfordul. Az NO termelődés utáni sorsa többféle lehet.

Metallo-enzimekben az átmeneti fémekhez koordinációs kötéssel kapcsolódik (citokróm P450 (237), guanilát cikláz, hemoglobin, ciklooxigenáz, kataláz stb. (276). Talán legjelentősebb ebből a szempontból a ferro (Fe^{2+}) vashoz való kapcsolódása, amit elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópos detekciója során kihasználnak (290).

A klinikai gyakorlatból a nitrátok (nitroglicerín, izoszorbid-mononitrát, izoszorbid-dinitrát), a nitróthiolok és a nitroprusszid nátrium említenő, mely utóbbiban az NO

komplex kötésben van, és ahonnan az NO redukáló hatásokra szabadul fel (287).

3.2.7.1. A guanilat cikláz enzim aktiválása

Az NO fiziológias hatását nagyrészt a GC aktiválásán keresztül fejt ki, cGMP által kiváltott fehérje foszforilációkon keresztül. Ezek a hatások összességükben, többek között, kiváltják a citoplazmatikus, ionizált és diffuzibilis kalcium szintjének csökkenését is (118, 140, 176, 177).

Megjegyzendő azonban, hogy a szolubilis GC enzim aktiválódhat NO nélkül is: új szabályozóhelyet fedeztek fel az enzimen, mely egy bizonyos pirazolopiridin vegyülettel stimulálható, és mely aktiválás következményeként trombocita-gátlást és jelentős vérnyomáscsökkenést figyeltek meg (278).

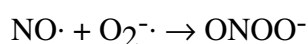
3.2.7.2. Oxidációs végtermékek keletkezése: NO_x

Az NO sejtenyészeten gyorsan nitritté (NO₂⁻) oxidálódik, de Fe²⁺ hem (pl. a vörösvérsejt hemoglobinjában), vagy más átmeneti fémek jelenlétében a sokkal stabilabb nitráttá (NO₃⁻) konvertálódik. Így, a NO₂⁻ in vivo rövid féléletidejű, és a főként előforduló stabil végtermék a NO₃⁻. A NO₂⁻-et és NO₃⁻-ot összefoglalóan NO_x-nak is jelöljük. A szervezetben előforduló NO_x kb. 50%-a származik az NO szintézis szubsztrátjából, az L-arg-ből, jelentős mennyiség kerül a szervezetbe a diétával (főleg zöldségek, ivóvíz, illetve tartósítószer), kis mennyiség az NO-val szennyezett levegőből. A NO_x kb. 60-70%-a a vizelettel, 1-3%-a a széklettel, némileg a nyállal (bizonyos mértékben a gyomor-bélrendszerből vissza is szívódik), izzadsággal választódik ki. Valószínűleg nagy mennyiségben bomlik le a gyomor-bélrendszerben, bakteriális degradáció révén. Vizelettel ürített napi mennyisége (kizárólag alacsony diétás NO_x bevitel esetén: 24-48 óra után, és steril vizeletben), illetve plazmában előforduló koncentrációja (kizárólag alacsony diétás NO_x bevitel esetén és legalább 12 órás éhezés után) utal a teljes test NO termelésére (29).

3.2.7.3. Reakció szuperoxid anion szabad gyökkel és nitroziláció

A szuperoxid anion szabad gyök a NADH/NADPH oxidáz, a xantin oxidáz, a NOS, a ciklooxigenáz és a mitokondriumok működése révén termelődhet.

Az NO különösen nagy sebességgel reagál el a szuperoxid anion szabad gyökkel, miközben peroxinitrit képződik (81):



A peroxinitrit élettartama szintén rövid ($T_{1/2} = 0,5$ sec), hidroxil és nitrogén dioxid ($\text{NO}_2\cdot$) szabad gyökké alakul:



Mindkettő lényegesen toxikusabb szabad gyök mint az NO. A hidroxil szabad gyök DNS töréseket okozhat (31).

A peroxinitrit kifejezett tiol oxidációs hatással rendelkezik (nitrozotiol-képződés), mely károsítja a sejteket (73), vas-nitrozil komplexek, oxidált szulfhidridek keletkezését okozhatja (106).

Továbbá, a peroxinitrit fehérjék tirozin reziduumait is nitrálhatja, ami nitrotirozinek képződéséhez vezet (31, 106).

A peroxinitrit többek között fontos része a sejtes immunitás folyamatának is, infektív ágenseket és idegen sejtet ölő aktivitása miatt (166).

3.2.8. Az NO fiziológiás szerepe általánosságban

A fiziológiásan termelődő NO (cNOS hatása) aktiválja a simaizomban levő szolubilis guanilát cikláz enzimet, mely GTP-ből cGMP-t termel, ez simaizomrelaxációt okoz, illetve gátolja a trombociták összezsugorodását és az endotéliumhoz való tapadását, valamint a fehérvérsejtek adhézióját az endotéliumhoz. Így a cNOS által termelt NO fiziológiás funkciói a vazodilatáció (parakrin hormonhatásként az endotelialis NO esetében), a trombocita aggregáció és a fehérvérsejtek endotéliumhoz történő adhéziójának gátlása (endokrin hormonhatásként, ha az endotélium által termelt NO hatását tekintjük, és autokrin hormonhatásként, ha a trombocita által termelt saját NO kiváltotta hatást vesszük figyelembe), és a neuronális ingerület-transzmisszió.

A cNOS által termelt NO további fontos funkciója lehet, hogy lipoldékonysága révén bekerülve a biológiai membránokba, az ott zajló lipid peroxidációs folyamat propagációját meggátolhatja az alkoxil és a peroxil gyökökhöz való kötődés révén (96).

Az NO-nak számos más szerepe is van. A jelátviteli mechanizmusokban gátolja saját szintetizáló enzimét, a NOS-t (negatív visszacsatolás), de gátolja a 12-lipoxigenázt, a citokróm P450-t, befolyásolja a ciklooxygenáz működését. Több receptor működésére, jelátviteli mechanizmusokra, a sejt energia-metabolizmusára is hatással van. Gátolja a DNS-szintézist, befolyásolja a vas metabolizmust, az apoptózist. Gátolja a Mn/Fe szuperoxid dizmutázt, a glutation reduktázt, a katalázt, az alkohol dehidrogenázt, a cöruoplazmint, stb. (164).

3.2.9. Az NO fiziológiás szerepe a vesében

Az NO-nak a vese-hemodinamika szabályozásában betöltött szerepét foglalja össze a 3. ábra. Az NO-nak szerepe van a glomeruláris hidrosztatikus nyomás meghatározásában, a glomeruláris vérátáramlás szabályozásában (befolyásolja az afferens arteriola tónusát, a renin-elválasztást, a tubuloglomeruláris feedback-et), a mezangium tónusának meghatározásán keresztül hat a glomeruláris filtrációs felület nagyságára, így megváltoztathatja a glomeruláris ultrafiltrációs koefficienszt (K_f), végeredményben a GFR-t; befolyásolja a makromolekulák mezangiális "közlekedését"; az erek tónusának befolyásolásával hat a teljes vese-vérátáramlásra (a glomerulusok mellett hat a medulla véráramlására is), a szisztémás vérnyomásra; ezek mellett antitrombotikus hatása is van. Az NO-nak fiziológiásan fontos feladata még a sejtmembrán nátrium pumpájának szabályozása, így jelentős szerepe van a tubulusok nátrium visszaszívásában. Továbbá az NO az angiotenzin II fiziológiás antagonistája mind a glomerulusokban, mind a tubulusokban, így potens antiproliferatív hatású az erek simaizomzatára, mezangiumsejtekre és fibroblasztokra (153, 154, 217, 228, 241, 242)

3.2.10. Az endotél diszfunkció celluláris és molekuláris mechanizmusai

Az endotél diszfunkció az L-arg-NO rendszer működését befolyásolja, ami többféle módon lehetséges: mind a NOS enzim szubsztrátjának (L-arg) abszolút vagy relatív hiánya, a NOS expressziójának, illetve szerkezetének megváltozása, az NO jelátviteli mechanizmusának változása, a tetrahydrobiopterin hozzáférhetőségének korlátozottsága, az NO reaktív oxigén eredetű gyökökkel történt destrukciója – melyben nagy szerep jut a szuperoxid anion fő termelőjének, a NADH/NADPH oxidáznak, mind olyan tényezők, amik csökkenthetik a fiziológiásan termelődő NO mennyiségét (114).

A különböző útvonalak bizonyos részleteit illetően utalunk korábbi fejezeteinkre, a teljesség igénye nélkül, illetve saját kísérleteinkre. Természetesen, az L-arg-NO rendszeren kívül más molekuláris folyamatokat is érint az endotél diszfunkció, ezek részletezése azonban jelen munka kereteit meghaladja.

3.2.11. Az NO patofiziológiás szerepe és a vesebetegségek

Ingerületátvivőként, vazodilatátorként és a gazdaszervezet védekezésében az NO-nak jótékony hatásai vannak. A nagy mennyiségű NO termelődés viszont citotoxikus hatású: reaktív oxigén és nitrogén szabad gyökökkel való reakciója során, melynek kapcsán

peroxinitrit keletkezik, fehérjék tirozin nitrációja révén és hidroxil szabad gyök keletkezése miatt (4, 153, 154, 228, 241, 242).

Az NO hozzájárulhat többféle vesebetegség (bizonyítottan immun-mediált glomerulonephritis, rádiokontraszt anyag indukálta nefropátia, obstruktív nefropátia, akut és krónikus allograft rejekció) kialakulásához, szerepe lehet a diabeteses nephropátiában, az urémiás trombocita-diszfunkcióban, a rekurrens trombotikus mikroangiopátiákban, emellett az ateroszklerózisban, a sószenzitív hipertónia, a volumen-függő hipertónia patogenezisében, és a posztisztkémiás veseelégtelenségben is (23, 228).

a.) NO túltermelődés

Az indukálható enzim révén nagy mennyiségben termelődött NO a gyulladásban és immunitásban játszik jelentős szerepet. Bakteriális lipopoliszaccharidok, TNF- α , IL-1 és γ -interferon indukálják az iNOS expresszióját, míg a szöveti regeneráció citokinjei gátolják (TGF- β , PDGF, EGF, IL-4, IL-8).

Szuperoxid anion szabad gyökkel peroxinitritet képezve erős oxidáló hatású az idegen organizmusokkal (pl. baktériumok) szemben, de citotoxikus nitroziláló hatása és számos enzimet inaktiváló hatása miatt is (4, 23, 217, 153, 154, 228, 241, 242).

Továbbá, az NO (iNOS eredetű) gátolja az ODK enzimet (valószínűleg az enzim nitrozilációja révén) és a putreszcin transzportert, ami a poliamin szintézist látja el prekuzorral. Ezeken keresztül az NO gátolja a sejtproliferációt (37).

Elsődleges patogén szerepe van az NO túltermelődésnek immun-mediált glomeruláris károsodásban. Az NO (valószínűleg iNOS termeli) számos sejtfeleségből származhat: így infiltráló makrofágokból és rezidens vesesejtekből (pl. mezangiális sejtekből) is.

Az excesszív mennyiségű NO szepszisben, és normális terhességben is glomeruláris trombózishoz vezethet, amit valószínűleg az eNOS szubsztrát depléciója és lokálisan csökkent eNOS általi NO termelése okoz.

Bizonyos esetekben, hemodializált betegekben, bioinkompatibilis dializáló membrán iNOS aktiváló hatása révén hipotenzio alakulhat ki.

Továbbá, a vese allograft rejekcióját – legalábbis részben – citotoxikus mennyiségű NO termelődése okozhatja.

Korai diabeteses hiperfiltráció hátterében is állhat részben a túltermelődött NO (23).

b.) NO hiány

A fiziológiásan termelődő NO hiányának szintén jelentős szerepe van vesebetegségekben.

A Dahl-sószenzitiv patkányokban például magas diétás sóbevitel csökkent NO termelést okoz, ami hozzájárul a magas vérnyomáshoz, vesediszfunkcióhoz és vesekárosodáshoz.

Kísérletesen, magas sóbevitel és alacsony dózisu NOS inhibitor az extracelluláris volumen expanzióját, sófüggő hipertóniát okoz. Nagyobb dózisu NOS inhibitor adagolása már normális vagy alacsony sóbevitel mellett is hipertóniát és vesekárosodást okoz. A glomeruláris hipertónia mellett az NO hiány mezangiális és vaszkuláris simaizomsejt expanziót és extracelluláris mátrix túltermelődést okoz, amik hozzájárulnak a glomeruláris károsodáshoz.

Az NO hiány klinikai jelentősége esszenciális hipertóniában még nem teljesen világos, de az állatkísérletes eredmények alapján elsődleges szerepe lehet a betegség alacsony renin-termeléssel járó formájában.

Továbbá, végstádiumú vesebetegekben is NO hiány alakul ki; illetve krónikus vesebetegségben is, még a végstádium előtt, az NO hiánya hozzájárul a vesebetegség progressziójához (23).

3.2.12. Összefoglalás

A NOS enzim L-arg-ból NO-ot és L-cit-t hasít, NOHA intermedier keletkezésén keresztül. Az NO lipofil, rövid féléletidejű ($T_{1/2}=2-6$ másodperc), mivel nagyon reaktív molekula; melyet fiziológiásan főleg a vörösvértest hemoglobinja oxidál stabil végtermékké (NO_x keletkezik), illetve a szuperoxid anion gyök inaktívál peroxinitrit keletkezése közben (ha a szuperoxid anion szintje megnő, és nem bontja el a szuperoxid dizmutáz), ami igen reaktív oxidáns. Az NO aktiválja a simaizomban levő szolubilis guanilat cikláz enzimet, mely GTP-ből cGMP-t termel, ez simaizomrelaxációt okoz, illetve gátolja a trombociták összecsapódását és az endotéliumhoz való tapadását, valamint a fehérvérsejtek adhézióját az endotéliumhoz. Az NO hiánya illetve túltermelődése – a vesebetegség típusától, stádiumától, egyéb faktoroktól függően – hozzájárulhat a vesebetegség kialakulásához, illetve progressziójához.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt az L-Arg - NO rendszer befolyásolhatóságának vizsgálata in vitro és in vivo, egészséges és kóros, vesebetegségre jellemző, illetve annak progresszióját befolyásoló néhány körülmény között, illetve előbbieik modelljeiben, végül ezek klinikai jelentőségének megítélése. Így:

- Terveztük a mikrocirkulációból származó endotélsejtek intakt L-arg - NO rendszerének felmérését in vitro.
- Vizsgálni kívántuk az L-arg - NO rendszert in vitro befolyásoló néhány faktort is:
 - a dohányfüst hatását,
 - a szabad gyök-termelést hiperinzulinaemiában,
 - az L-arg nem enzimátikus glikációját,
 - a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatását,
 - az urea hatását.
- In vitro kísérleteink alapján kutatni kívántuk az urea in vivo hatását is, állatokban.
- Humán vizsgálatainkban (IgA nefropátiás beteganyagunkban) vizsgálni kívántuk
 - az endoteliális vasoactív anyagok termelődését,
 - a dohányzás hatását,
 - az ambuláns vérnyomásmonitorozás szerepét a hipertónia diagnózisában és követésében (terápiás döntések befolyásolása),
 - a hosszú hatású ACE-gátlók és Ca-csatorna blokkolók szerepét a hipertónia kezelésében.

5. MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK

5.1. Endotélsejtek intakt L-arg - nitrogén monoxid rendszere in vitro

(tézis I, **publikáció 6, 17, 29**)

Az érrendszer endotél funkciójában szignifikáns különbségek fedezhetők fel. Például különbség van a konduktív erek és a rezisztenciaerek között, de a rezisztenciaerek különböző szintjei között is, ugyanabban az érrendszerben (41). Ezek a differenciák jelen lehetnek akár ugyanazon az éren belül is, mint szegmentális különbségek, az NO és a ciklooxygenáz-függő anyagok termelő képességében (2, 260). A fenotípusosan megjelenő különbségek gyakran megmaradnak sejtenyészetben is, például aortából izolált endotélsejtek a pulmonáris arteriolák endotélsejtjeinél több NO-t termelnek (103). Továbbá bizonyítékok vannak az artériák és vénák endotélsejtjeinek heterogenitására is (41). Célunk volt a mikrocirkulációból származó párosított arterioláris és venuláris endotélsejtek alap (öröklött) NO termelő képességének meghatározása és összehasonlítása.

5.1.1. Módszerek

Sejtek izolálása: A patkány mezentériumából származó arterioláris (RMAEC) és venuláris (RMVEC) endotélsejtek izolálásához Boegehold és mkti módszerét alkalmaztuk (42; 4. ábra). A prekapilláris RMAEC nyeréséhez a vena mesenterica superior kanülálása után retrográd módon mostuk a mezenterikus érrendszert 0,8 ml steril elektrolit oldattal, majd feltöltöttük 10 ml steril oldattal (M199 + 10% FBS, 10.000 U/ml penicillin, 10.000 µg/ml streptomycin), mely 6%-ban vasrészecskéket tartalmazott, szuszpenzióban. A vasrészecskék átmérője 4-5 µm. Mikroszkóp alatt ellenőriztük a részecskék egyenlő eloszlását a mezentérium prekapilláris és kapilláris érhálózatában. A vasrészecskék nem jutottak át az arterioláris, posztkapilláris régióba. Ezután a mezentérium e részét, mely az arteria és vena mesenterica superior 3-6. rendű ágait (normál körülmények között az artériák alap átmérője 170 µm: 3. rendű ágak és 80 µm: 6. rendű ágak közötti) tartalmazta, kivágtuk. Direkt mikrovaszkuláris nyomásméréssel korábban igazolták, hogy ezek az erek felelősek a teljes mezenterikus/intesztinális vaszkuláris rezisztencia kb. 40%-áért (48), és így jelentős szerepük van a lokális vérátáramlásban. A kivágott szöveteket apróra daraboltuk, majd a vassal töltött vénás és kapilláris ereket mágnesesen szeparáltuk, eldobtuk, míg a maradék arteriális szegmenseket és szabad sejteket 850 g-vel centrifugáltuk 5 percig. Az üledéket 5 ml 0,25%-os tripszin-EDTA-ban reszuszpendáltuk, 37 °C-on 10 percig inkubáltuk - emésztettük. Az erek teljes disszociációja, és a megmaradt sejtek diszperziója után az endotélsejteket mágneses mikrogöngyökhöz kapcsoltuk - PECAM-1

antitest segítségével, majd mágneselesen elkülönítettük őket. A RMVEC izolálása hasonló módon történt, azzal a különbséggel, hogy 5%-os vasrészecske-szuszpenziót infundáltunk az arteria mesenterica superiorba a vena mesenterica superior helyett. Közvetlenül ez előtt az artériát 1 ml 10 mM-os adenzin oldattal öblítettük, hogy maximálisan tágítsuk az artériás hálózatot. Az endotélsejtek tisztaságát tenyésztés után igazoltuk: natív morfológia (5. ábra), LDL-felvétel (6. ábra) és von Willebrand-faktor pozitivitás alapján (7. ábra).

Sejtenyésztés: Mindkét sejttípust konfluálásig 12 üregű sejttálcán tenyésztettük a NOS aktivitás és az L-arg transzport mérésekhez és a sejtszámláláshoz (10.000 sejt/üreg kezdeti sejtszámmal; a konfluencia eléréséhez szükséges átlagos idő 3 nap a venuláris sejteknél és 4 nap az arterioláris sejteknél), illetve T-75-ös edényben a Western blot és L-arg koncentrációs vizsgálatokhoz. A sejteket M199E médiumban tartottuk (Medium 199 + Earle-sók, 30% FBS, 40 µg/ml endoteliális növekedési faktor, 1,5 U/ml heparin, 200 U/ml penicilin, 200 µg/ml streptomycin, 14 mM HEPES, pH 7,4), 37 °C-on, 95%-os páratartalom alatt, 5% CO₂ és 95% levegő atmoszférában, illetve a médiumot másnaponta cseréltük. Harmadik és ötödik passzázs közötti sejteket használtunk.

NOS aktivitás mérése: A NOS aktivitást élő sejtekben az [³H]L-arg - [³H]L-cit konverzió mérése alapján határoztuk meg, Xiao és mkti (318) szerint, Davda és mkti módszere (75) alapján. A 12 üregű sejttálcákban konfluáló endotélsejteket 1 órán át inkubáltuk 37°C-on, 50 µM izotóppal nem jelölt L-arg-t, 1µl [³H]L-arg-t tartalmazó, 500 µl Krebs-HEPES pufferrel (esszé puffer). A kísérletet az edénykék "stop oldattal" (10 mM L-arg jéghideg PBS-ben, 0,5 ml) történő háromszori, gyors mosásával állítottuk le, ezáltal távolítottuk el az extracelluláris jelölt L-arg-t, illetve akadályoztuk meg az intracelluláris L-arg kilépését a sejtekből. A sejteket ezután 1%-os Triton X-100 oldattal szolubilizáltuk. A lizátumból folyadékszintillációs számlálóval mértük a sejtek által felvett [³H]L-arg mennyiségét, illetve a sejtlizátum egy részét 50% Dowex 50WX8-400 gyantával kezeltük, hogy eltávolítsuk a nem konvertált [³H]L-arg-t, így mértük a [³H]L-cit-t is. A háttér radioaktivitást levontuk. A NOS aktivitást az L-cit-ná konvertált L-arg mennyiségként mértük, pmol/perc/mg protein-ben. A számolást a következő képlet segítségével végeztük: NOS aktivitás = { [(L-cit radioaktivitása - háttér radioaktivitás) / össz radioaktivitás az esszé pufferben X össz L-arg koncentráció az esszé pufferben] / protein mennyiség a sejttálca edénykéjében } / inkubációs idő (60 perc). Paralell kísérletben, az esszé puffert a NOS-t gátló L-NMA-val (5 mM) egészítettük ki, hogy meghatározzuk, az L-arg konverziója a NOS enzimen keresztül történik-e.

L-arg transzport mérése: Gazzola és mkti (102) részben módosított, módszerét használtuk. A 12 üregű sejttálcákban konfluáló endotélsejtekről eltávolítottuk a reguláris M199E médiumot, majd az edénykéket Krebs-HEPES pufferrel mostuk szobahőmérsékleten, ezután 50 μ M izotóppal nem jelölt L-arg-t, 1 μ l [3 H]L-arg-t tartalmazó, 500 μ l Krebs-HEPES puffert adtunk a sejtekhez. A transzportot 3 perc múlva állítottuk le, az izotópot tartalmazó puffer gyors eltávolításával és mosással (3x, jéghideg 10 mM L-arg-t tartalmazó PBS), a NOS aktivitás méréséhez hasonló módon. A sejteket ezután 0,5 M NaOH-ot tartalmazó 0,5 %-os Triton X-100 oldattal szolubilizáltuk, és a lizátumból folyadékszintillációs számlálóval mértük a sejtek által felvett [3 H]L-arg mennyiségét. A háttér értéket (paralell kísérletben, sejteket 10 mM jelöletlen L-arg-t tartalmazó Krebs-HEPES pufferrel inkubáltunk) levontuk.

A sejtek összfehérje tartalmának meghatározása: A sejt-lizátumokból az összfehérje meghatározása a BioRad DC Protein Assay Kit Hercules, CA, USA) segítségével történt, Lowry módszerének adaptációja alapján (181, 229).

Sejtszámlálás: Az egyes edénykékből a sejteket (mobilizálásuk után, 0,25%-os tripszin-EDTA kezeléssel) Coulter Counter (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, USA) segítségével számláltuk.

Western blot: A T-75-ös edényekben konfluáló endotélsejteket izoláltuk és jéghideg pufferrel (1% Triton X-100, 20 mM bázikus Tris, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 mM ditiotreitól, 1 mM nátrium ortovanadát, 0.1 mg/ml PMSF, 0,01 mg/ml leupeptin, 0,01 mg/ml aprotinin) lizáltuk, majd a sejtoldatot 4°C-on centrifugáltuk (10.000 g, 10 perc). A felülúszót 2x-es töménységű mintapufferrel elegyítettük, majd 2 percig forraltuk, ezután 7,5%-os homogén SDS-poliakrilamid minigélen elektroforetizáltuk (200 V, 65 perc). A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (60 mA, 105 perc, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A fehérjék gélre történt egyenlő mértékű felvitelét és transzferét Ponceau vörös festéssel és a β -aktin mennyiségének mérésével vizsgáltuk (lásd lejjebb). Az eNOS-t egérben termelt monoklonális antitesttel (1:1.000-es hígításban, 3 % zsírmentes tejport tartalmazó TBS-T oldatban, 1 órás inkubáció) jelöltük, majd a membránt másodlagos antitest oldatban (kecskében, egér ellen termelt IgG-tormaperoxidáz konjugátummal, 1:2.000-es hígításban, 3 % zsírmentes tejport tartalmazó TBS-T oldatban, 1 órán át) inkubáltuk. Ezután a membránokról az antitest-komplexumot eltávolítottuk, majd membránokat újra blottoltuk a β -aktin kimutatásához: elsődleges antitest - egérben termelt, monoklonális, 1:60.000-es hígításban, 2 % zsírmentes tejport tartalmazó TBS-T oldatban, 1 órás inkubációval;

másodlagos antitest - kecskében, egér ellen termelt IgG-tormaperoxidáz konjugátum-mal, 1:60.000-es hígításban, 2 % zsírtmentes tejpórt tartalmazó TBS-T oldatban, 1 órán át (190 Mattson és Bellehumeur, 1996 nyomán). A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. A vizsgált fehérjéket kemilumineszcenciás módszerrel mutattuk ki, ECL-reagenssel (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) történt 1 perces inkubáció után, Kodak X-omat AR filmen (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA). Optimas 6.2 képanalizáló szoftver (Bothell, WA, USA) segítségével végeztük a denzitometriás méréseket, integrált optikai denzitást mértünk (IOD), a háttér denzitást levontuk a kapott értékekből.

Az L-arg koncentráció méréséhez a sejteket az izolációt és lízist megelőzően a következőképpen kezeltük: kontroll (MEM oldat) és NOS-gátolt (MEM + 5 mM L-NMA) sejteket (T-75 edényekben) 2 órán át standard körülmények között tartottunk, sejttenyésztő inkubátorban. Ezután a sejteket jég hideg PBS oldattal mostuk (3x), hogy eltávolítsuk az extracelluláris L-arg-t. Az L-arg mérése a mosott sejtlizátumokból reverz fázisú HPLC-vel történt, prekolumnáris derivatizációval, fluorescens detekcióval, AccQ-Tag módszerrel (264, 265). A sejtlizátumokat ultrafiltráltuk (10.000-es molekulásúly-küszöbvel), hogy eltávolítsuk a fehérjéket. A szűrt mintákat 55°C-on 6-aminoquinolil-N-hidroxi-szukcinimidil karbamáttal derivatizáltuk. Duál pumpával vittük fel a mobil fázist (140 mM nátrium acetát 17 mM trietilaminnal, pH=5,05 és 60% acetonitril) 1 ml/perc-es sebességgel, az AccQ Tag C18-as oszlophoz tartozó gradiens táblázata szerint. Automata adagolóval 10 µl-es mintákat injektáltunk. Az eluált oldatot 5 µl-es átfolyó cellában, fluorescens módszerrel detektáltuk (excitáció: 250 nm, emisszió: 395 nm, erősítés: 100). A koncentrációkat Millennium Chromatography Manager v 2.1 (Waters Corp., Milford, MA) segítségével számoltuk.

A mikrocirkulációból származó erek sebészi eltávolítása: Nátrium tiopentál túladagolása után a patkányokat leöltük, majd a vékonybél egy szegmensét és a hozzá tartozó mezenteriumot eltávolítottuk, és kifeszítettük silastic-kal fedett, 4°C-os fiziológias sóoldatot tartalmazó petri csészében. Disszekáló mikroszkóp alatt, ugyanolyan rendű pre- és posztkapilláris érágakat használtunk endotélsejtek izolációjához. Az érszegmenseket azonnal 4°C-os 28% FBS-t és 10% dimetilszulfoxidot tartalmazó M199-be helyeztük, 2 órára -20°C-on, majd -70° C-on rövid ideig tároltuk. Továbbá, izoláltuk a mezenterikus artériát és vénát is, amiket lefagyasztottunk -70°C-on. Minden értípust több patkányból összegyűjtve (n=10 patkány), és a következők szerint használtunk fel: a mikroereket meleg víz alatt gyorsan olvasztottuk, majd 4°C-on centrifugáltuk 8 percig 5.500 g-n. A centrifugált

szegmenseket homogenizáltuk 75 µl lízis pufferben, majd újra centrifugáltuk 10 percig 10.400 g-n. Az összegyűjtött, fagyasztott mezenterikus artériákat és vénákat porrá törtük, majd 100 µl lízis pufferben oldottuk, illetve a felülúszót a fentiek szerint gyűjtöttük. Western blot analízist végeztünk a fent említettek szerint, azzal a különbséggel, hogy a primér eNOS antitest hígítása 1:200 volt, és a β-aktin esetén 1:10.000-es hígítást használtunk mind a primér, mind a szekundér antitest esetén.

Felhasznált anyagok és forrásaik (mind USA): MEM-, HBSS-, HEPES-oldatokat (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY); FBS (Atlanta Biologicals, Inc., Norcross, GA); L-NMA-t (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA); monoklonális anti-eNOS antitestet (Transduction Laboratories, Lexington, KY); endoteliális növekedési faktort (Becton and Dickinson, Bedford, MA); T-75-ös tenyésztő flakát (Sarstedt, Inc., Newton, NC) vásároltunk. Fehérje meghatározáshoz reagenst, ammónium perszulfátot, kecskében termelt egér-elleni IgG-tormaperoxidáz konjugátumot, molekulasúly markert a BioRad Laboratories-tól (Hercules, CA) szereztünk be. Hybond ECL nitrocellulóz membránt, ECL Western blot reagenst és [³H]L-arg-t (L-[2,3,4,5-³H] arg monohidroklorid formájában) az Amersham Pharmacia Biotech-től (Piscataway, NJ) vettünk. Metanolt, dinátrium hidrogén foszfátot, nátrium dihidrogén-foszfátot, triklórecetsavat, Tris-HCl-t, 12-üregű sejtenyésztő tálcát, magnézium kloridot, HPLC-tisztaságú vizet és acetonitrilt a Fisher Scientific-től (Fair Lawn, NJ) rendeltünk. A fent nem említett, HPLC-hez használt anyagokat a Waters Corporation-től (Milford, MA) vásároltuk. M199 tápfolyadékot, Dowex 50WX8-400-as gyantát, L-arg-t, monoklonális anti-β-aktin antitestet, Kodak X-omat AR filmet, Whatman filter papírt és minden más kemikáliát a Sigma-Aldrich Co.-től (St. Louis, MO) szereztünk be.

Statisztikai analízishez a Student t-tesztet használtuk mind a NOS-aktivitás, az L-arg koncentráció és transzport méréseknél, mind az arteriolo-venuláris IOD-értékek összehasonlításánál. Az átlagot és a SE-t számoltuk ki. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha $p < 0,05$.

5.1.2. Eredmények

A 8. ábra mutatja be a Western blot mérések eredményeit. Az eNOS mennyisége szignifikánsan magasabb volt RMVEC-ben, mint RMAEC-ben (* $p < 0,05$; venuláris/arterioláris arány: $185 \pm 13\%$, $n=13$ mindkét csoportban). A β-aktin szint hasonló volt mind RMVEC-ben, mind RMAEC-ben (venuláris / arterioláris arány: $101 \pm 5\%$, $n=13$), megerősítve az egyforma mennyiségű fehérjefelvittelt a géltre a különböző mintákból.

Reprezentatív blot mutatja be az eNOS és β -aktin fehérjéket a 9. ábrán.

A 10. ábrán kitűnik, hogy a sejtek alap NOS aktivitása nagyobbak bizonyult RMVEC-ben, mint RMAEC-ben ($19,32 \pm 0,60$ vs. $11,47 \pm 0,31$ pmol/perc/mg protein, * $p < 0,001$, $n=14$ és 17). 5 mM L-NMA szignifikánsan gátolta a NOS aktivitást mind RMVEC-ben (77 ± 4 %-kal, * $p < 0,001$, $n=4$), mind RMAEC-ben (69 ± 4 %-kal, * $p < 0,001$, $n=7$), mutatva, hogy az L-arg metabolizmusa főleg a NOS enzimen keresztül történik.

Az intracelluláris L-arg koncentráció szintén magasabb volt RMVEC-ben, mint RMAEC-ben (478 ± 25 vs. 259 ± 17 μ M, * $p < 0,001$, $n=5$ mindkét csoportban, 11. ábra), és jelentősen az eNOS K_m értéke felett (ami kb. 3 μ M; 231). L-NMA mindkét sejtípusban szignifikánsan emelte az L-arg koncentrációt (RMVEC: 729 ± 22 μ M, RMAEC: 390 ± 13 μ M, $n=5$, # $p < 0,001$ mindkét esetben).

Bár a venuláris endotélsejtekben magasabb L-arg koncentrációt találtunk, az L-arg transzportja nem volt nagyobb RMVEC-ben (12. ábra): 50 μ M extracelluláris L-arg jelenlétében, ami a normál plazmaszint alsó határán van, hasonló mértékű transzportot (RMVEC: $409,7 \pm 16,9$ vs. RMAEC: $435,3 \pm 8,9$ pmol/min/mg protein, NS, $n=6$), míg 500 μ M-nél alacsonyabban mértünk RMVEC-ben, mint RMAEC-ben ($738,2 \pm 12,9$ vs. $935,4 \pm 28,1$ pmol/min/mg protein, $p < 0,001$, $n=6$).

A 13. ábra mutatja, hogy az eNOS fehérje jelentősen kisebb mennyiségben van jelen az intakt arterioláris vs. venuláris erekben, míg a géltre felvitt teljes fehérjemennyiség ugyanannyi volt (eNOS / Ponceau vörös IOD, 0,007 vs. 0,04). Az eNOS mennyisége nagyjából megegyező volt a mezenterikus arteriákban és vénákban (0,057 vs. 0,067; a SE-t nem adjuk meg, mivel a minták 10 patkányból összegyűjtött szövetekből származnak, hogy a módszerhez elegendő mennyiségű fehérjét nyerhessünk).

5.1.3. Összefoglalás

A patkány mezentérium mikrocirkulációjából származó venuláris endotélsejtek több eNOS izoenzimmel, nagyobb NOS aktivitással, magasabb L-arg koncentrációval rendelkeznek, mint az arterioláris endotélsejtek. Az L-arg transzportjában nincs különbség a két sejtípus között. L-NMA mindkét sejtípusban csökkenti a NOS aktivitást és növeli az intracelluláris L-arg koncentrációt. Továbbá, in vivo is nagyobb mennyiségű eNOS fehérje található a mezenterikus venulákban az arteriolákhoz képest. A posztkapilláris endotélium nagyobb alap NO termelése tükrözheti a venuláris NO hozzájárulását az arteriolák tónusának kontrollálásához, és szerepe lehet a lokális trombózis gátlásában is.

5.2. Az L-arg - NO rendszert befolyásoló néhány faktor in vitro vizsgálata

5.2.1. A dohányfüst hatása az NO-cGMP útvonalra: cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben (tézis II, III, publikáció 10, 28)

Az NO-cGMP rendszer érzékeny a sejteket ért oxidatív stresszre. Az NO termelődésének kimutatására a guanilát cikláz enzim aktiválódása során létrejövő cGMP felszabadulás mértékének meghatározását választottuk. A dohányzás az egyik legfontosabb cardiovascularis rizikófaktor, akut inzulin rezisztencia szindróma-szerű képet okozhat (95). A dohányfüst toxikus összetevői közül sok a szabad gyök tulajdonságú (pl. a nitrogén oxidált származékai), más komponensek, mint pl. a formaldehid, olyan elváltozásokat okoznak a sejtek antioxidáns védekező rendszerében, amelyek a sejteket a szabad gyökök behatásokra érzékennyé teszik. A formaldehid a redukált glutation szulfhidril csoportjához kötődhet, elfogyasztva így a szövetek egyik legfontosabb antioxidáns molekuláját. Ezáltal a sejtek SH-enzimjeinek aktivitása megváltozik, például a NOS inaktiválódhat.

5.2.1.1. Módszerek

Sejttenyészet: Általunk izolált disznó aorta endotélsejt (PAEC) kultúrákat használtunk 5-6 napos tenyésztés után, akkor, amikor a növekedés során konfluálóvá vált a tenyészet. Frissen szerzett disznó aorta lumenét II-es típusú kollagenáz-oldattal (2 g/l, Sigma, St. Louis, MO, USA) 20 percig, 37°C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó levegő és magas páratartalom mellett inkubáltuk, Sweeney és mkti (283) módszere szerint. Ezután az aortát 5x mostuk steril sejttenyésztő médiummal. A médium alapja az M199-oldat (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Skócia), melyet L-gln-nal (2,7 mM, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Skócia), penicillinnel (100 U/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA), streptomocinnel (100 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) és 10% hőinaktivált FBS-sel (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Skócia) egészítettünk ki. A sejtszuspenziót 1.500 g-vel centrifugáltuk, és a centrifugált sejteket újra elegyítettük az említett sejttenyésztő médiummal. Enyhe rázás és pipettázás (homogén sejtszuspenzió nyerése érdekében) után a sejtszuspenziót egyenlő arányban osztottuk szét 6-tálcás edényekbe (Dow Corning, USA). Hat-nyolc nap proliferációs idő után (közben másnaponkénti médiumcserével) standard sejttenyésztési körülmények között, a sejtek konfluáltak; ekkor használtuk fel őket kísérleteinkhez.

Dohányfüst puffer készítése: Kereskedelmi forgalomban kapható füstszűrős cigarettát (Camel) használtunk; egy szál cigaretta füstjét (géppel 5 perc alatt elszívva) Krebs-oldaton buborékoltattuk át, majd különböző (pl. 1:1 – tehát 50%) arányban hígítottuk. Ezt a SB (smoking buffer, dohányfüst puffer) oldatot használtuk a dohányzás hatásának modellezésére. A sejtek NO termelését bradikininnel indukáltuk. Az SB kezelés során, a bradikinin indukciót (100 nM) megelőzően, az SB különböző hígításaival előkezeltük a sejteket, illetve az időfüggés tanulmányozásakor ugyanazon SB koncentrációval különböző ideig preinkubáltunk. Az antioxidáns kísérletekben az SB adagolásával egyidejűleg történt az antioxidáns előkezelés. A sejtek sósavas (0,1 M) extraktumának cGMP koncentrációját határoztuk meg. Erre, minimális módosításokkal, a New England Nuclear kitéhez mellékelt módszert használtuk. A cGMP koncentrációs adatokat a sejtfehérje koncentrációjának függvényében fejeztük ki, a fehérje meghatározás Lowry szerint történt (181). 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) (214).

A formaldehid SH- csoport fogyasztását úgy mutattuk ki, hogy 10 mM GSH oldathoz növekvő koncentrációjú, maximum 10 mM 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 nM-os 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 (14. 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 (15. 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 μ M GSH

már szignifikánsan csökkentette az SB toxicitását, és 2 mM komplett prevenciót eredményezett (50%-os SB esetén; 16. ábra).

Mindezek alapján az SB cGMP termelést csökkentő hatásáért 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) μ mol formaldehid termelést mértünk 1 cigaretta elégeése során. Az Ellman reagenst használva, amely az intakt tiol csoportot mutatja ki, megállapítottuk, hogy a formaldehid koncentrációfüggően elfogyasztja a redukált glutation tiol csoportját (17. ábra).

Továbbá kimutattuk azt is (ábrán ill. táblázatban nem mutatott eredményeink), hogy a SB gátolta a bradikinin-kiváltotta kalcium-beáramlást is az endotélsejtekbe (28).

5.2.1.3. Összefoglalás

A dohányfüst hatására az endotélsejtek cGMP termelése csökken, a károsodás GSH segítségével kivédhető. A jelenség szabad gyökös 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.

5.2.2. *A dohányfüst fehérje degenerációt okozó hatásának mérése natív PAGE módszerrel (tézis IV, publikáció 25, 26, 27, 35)*

A dohányfüst fehérje degenerációt (szabad gyök-kiváltotta degradáció, és keresztkötések létrejötte, interbridging, azaz nagymolekulasúlyú termékek képződése) okozó hatásának kimutatására (amely minden valószínűség szerint érinti az NO-cGMP rendszert is) natív poliakrilamid gél elektroforézist használtunk.

5.2.2.1. Módszerek

Dohányfüst puffer (SB) készítése; endotélsejtek tenyésztése: részletes leírását lásd az 5.2.1.1. fejezetben.

Trombocitaszuspenzió készítése: a vért 5,8 mM EDTA-t tartalmazó pH 7,4-es glükóz-foszfát pufferrel kétszeresére hígítottuk. Azonnali elegyítést követően a mintát 200 g-vel 10 percig, szobahőmérsékleten (24 °C-on), kilendülő fejes rotorral centrifugáltuk. A trombocitákat tartalmazó felülúszót leszívtuk, majd ismét kétszeresére hígítottuk 5,8 mM

EDTA-t tartalmazó glükóz-foszfát pufferrel. Ezt követően 2.000 x g-n, szobahőmérsékleten 10 percig üleptítettük. A centrifugacső alján található vérlemezkékről a felülúszót egy határozott mozdulattal leöntöttük. A felülúszó leöntését követően a vérlemezkéket a sejtszámtól függő mennyiségű, pH 7,4-es foszfát pufferben vettük fel. A trombocita 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 Na₂HPO₄ x 2H₂O-ot, 0,2 g KCl-ot, és 0,2 g KH₂PO-ot. A glükóz 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 glükóz-foszfát puffer összeállításánál 2,26 ml 10 %-os EDTA-t adtunk 47,74 ml glükóz-foszfát puffer oldathoz.

Az SB-vel végzett kezelés után 10.000 x g-n végzett centrifugálással a vérlemezkéket leüleptítettük, majd Triton X-100-al kezeltük, mert a membránhoz kötött eNOS solubilizációjához detergensre van szükség (231). Az így nyert homogén oldat protein tartalmát Lowry módszere szerint határoztuk meg (181).

PAGE: Az elektroforézishez a trombocitaminták fent említett oldatát használtuk, míg andotélsejtek esetén konfluáló endotélsejt-tenyészetet SB-vel és esetenként antioxidánsokkal inkubáltuk. Ezután Triton X-100-al kezeltük a tenyészetet, és az így nyert folyadék fehérje tartalmát határoztuk meg.

Hígítással a minták protein tartalmát azonosra állítottuk be. Így az elektroforézis során minden helyre ugyanannyi fehérjét töltöttünk be. Az SDS PAGE módszerrel nem tudtunk kimutatni fehérjeszerkezetbeli eltérést SB jelenlétében, ezért natív PAGE vizsgálatot is végeztünk, melyhez 12,5%-os és 7,5%-os minigélt használtunk (PhastSystem, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Svédország). A futtatás után ezüstözést végeztünk. A fehérje frakciók molekulásúlyának becslésére natív molekulásúly standardot használtunk (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). A kapott géleket denzitometriás vizsgálattal analizáltuk.

5.2.2.2. Eredmények

A Triton X-100-al kezelt trombocitákban egy 270 kD molekulásúlyú fehérje (a natív, konstitutív, endoteliális NOS enzim molekula súlya 270 kD) denzitásának, azaz mennyiségének csökkenését tapasztaltuk. A fehérje az SB növekvő koncentrációi mellett végül teljesen eltűnt (18. ábra). Nagymolekulásúlyú aggregátumok, vagy kismolekulásúlyú

degradátumok nem voltak detektálhatók a 12,5 %-os gél felhasználásával. Az endotélsejt fehérjék vizsgálatakor ugyancsak a 270 kD molekulású fehérje eltűnését észleltük SB hatására, amit a redukált glutation (5 mM) teljes mértékben kivédett. Az oxidált glutation (GSSG, 5 mM) tovább fokozta a fehérje eltűnését (19. ábra). Kataláz (1000 E/l), szuperoxid dizmutáz (100 E/l), és a lipid peroxidáció gátlók (Trolox 0,1 mM, butilált hidroxitoluén /BHT/ 0,1 mM) nem fejtettek ki védő hatást (ábrán nem mutatott eredmények).

5.2.2.3. Összefoglalás

A dohányfüst hatására a trombocitákban és az endotélsejtekben 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.

5.2.3. A trombociták szabad gyök termelése hiperinzulinémiában (tézis V, **publikáció 7, 11, 20, 22, 34**)

Hyperinzulinaemia alakulhat ki csökkent glükóz toleranciában, kettes típusú diabetes mellitusban, illetve inzulin adagolás kapcsán. Az inzulin NO termelést indukál trombocitákban (289). Továbbá, az alábbiakban nem taglalt eredményeink alapján az inzulin gátolta a vérlemezke ATP kibocsátását. Az inzulin ezen hatását a NOS enzim szubsztrát L-arg felerősítette. Ezek alapján valószínűnek tartottuk, hogy az inzulin gátló hatásának intracelluláris hírvivője, a vérlemezke ATP-kibocsátás vonatkozásában, az NO (11).

Kíváncsiak voltunk, hogy a fiziológias és patofiziológias inzulin-szintek milyen hatással vannak az NO-termelésre, illetve 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.

5.2.3.1. Módszer

A 5.2.2.1. pont alatt leírtak szerinti trombocita-dús plazma (PRP) modellt használtuk. A PRP-be 150 μ M luminolt tettünk, ami vasfüggő- és vastól független oxidáció

hatására fényt bocsát ki. A vasfüggő kemilumineszcenciát, ami lehet lipid peroxidáció vagy hidroxil szabad gyök eredetű, dezferrioxamin (150 μM) hozzáadásával gátoltuk. A dezferrioxamin komplexálja a ferri (Fe^{3+}) vasat, és így gátolja a ferri-ferro (Fe^{3+} - Fe^{2+}) átalakulást. A lipid peroxidációhoz és a hidroxil szabad gyök képződéséhez szükség van a vas redox ciklusára. A hidroxil szabad gyök, az ún. Fenton reakcióban, szuperoxid anion 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 anion egymásrahatásából keletkezik. A kemilumineszcenciát LB 9505 típusú (Berthold, Wildbad, Germany) kemiluminométerrel detektáltuk. Annak igazolására, hogy az általunk alkalmazott dezferrioxaminos kezelés meggátolta a vasfüggő luminol oxidációt, katalázt (1300 E/l) adtunk 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 mM) és a BHT-t (0,2 mM) alkalmaztuk. Ha a dezferrioxamin hatékonyan gátolja a vasfüggő luminol oxidációt, akkor a kataláznak a Trolox és BHT kezelésnek ineffektívnek 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 anion szabad gyököt hidrogén peroxiddá alakítja, a NOS antagonistá pedig meggátolja az NO képződését. A szuperoxid dizmutázt 36-144 E/l-es és az L-NAME-t 0,5-4 mM-es koncentrációban alkalmaztuk. A trombociták aktiválódása során a prosztaglandin termelés nagymértékben megnő, ami szabad gyökök termelésével jár együtt. Ezért a ciklooxygenáz inhibitor acetilszalicilsavnak (0,05 mM) a kemilumineszcenciára kifejtett hatását is vizsgáltuk. 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.

5.2.3.2. *Eredmények*

Az inzulin koncentrációfüggő kemilumineszcencia-növekedést okozott, mint az az eredeti regisztrátumokat bemutató 20. ábrán látható. Ha a 84 pM koncentrációjú inzulin kiváltotta kemilumineszcenciás görbe alatti területet 100 %-nak vettük és ehhez viszonyítva ábrázoltuk a nagyobb koncentrációk okozta kemilumineszcenciát, akkor a 21. 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 vízzoldékonyabb formája, mind a BHT gátolja a lipid peroxidációt) keltette a kemilumineszcenciát. Ugyancsak inefektív 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 (22. ábra). Az AUC-keket kiszámolva, a 840 nM inzulin által kiváltott kemilumineszcenciás görbe alatti területet 100 %-nak véve látható, hogy az L-NAME koncentráció-függően csökkenti a kemilumineszcenciát (23. ábra). Hasonlóan az L-NAME-hez a szuperoxid dizmutáz enzim is koncentráció-függően csökkentette a kemilumineszcenciát. Az eredményeket az eredeti regisztrátumot bemutató 24. és a számított AUC értékek %-os arányát tükröző 25. ábrán demonstráljuk. (A 20., 22. és 24. ábrák 1-1 reprezentatív mérés eredményeit mutatják be.)

5.2.3.3. Összefoglalás

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

5.2.4. Az L-arg nem enzimátikus glikációja (tézis VI, VII, VIII, publikáció 12, 13, 14, 36)

Jelen tudásunk szerint, a nem-enzimátikus glikáció az egyik legfontosabb pathofiziológiai tényező a diabetes mellitus szövődményeinek kialakulásában. Több alkalommal is felvetették ennek esetleges szabad gyökös jellegét, pontos mechanizmusát azonban mind a mai napig nem tisztázták. Ha ezen szabad-gyökös folyamatokban szuperoxid anion szabad gyök is termelődhet, akkor az az 5.2.3 fejezetben leírtak alapján a nem-enzimátikus glikációnak is szerepe lehet az NO inaktiválásában.

Vizsgálatainkban ESR és spin trap ESR módszereket alkalmaztunk a glükóz és az L-arg egymásrahatásából termelődött szabad gyökök kimutatására. Az L-arg nem egy a sok aminosav közül, ami glikálódhat, hanem a NOS enzim szubsztrátja, ezért alapvető fontosságú lehet az L-arg nem-enzimátikus glikációból eredő módosulása. 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 mutatható 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 eredetű szabad gyökök kimutatására (szuperoxid anion, hidroxil szabad gyök stb.).

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

5.2.4.1. *Módszerek*

Először 90 °C körüli hőmérsékleten kíséreltünk meg kimutatni szabad gyökjelet. Foszfát-pufferelt sóoldatot (PBS) alkalmaztunk, pH 7,5 és 8 között. A detektálhatóság javítása érdekében magas koncentrációkat alkalmaztunk: 1 M glükózt, 1 M L-Arg-t. A gyöktermelést katalizátorral, vassal segítettük elő. A vas komplexek preparálása úgy történt, hogy ferri ammónium szulfátot 0,1 M HCl-ban oldottunk, és utána a megfelelő kelát képző anyaggal hígítottuk. A ferri-ATP komplexet 1:20 arányban, a ferri-EDTA komplexet 1:2 vas:komplex-képző arányban állítottuk elő. 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.

5.2.4.2. *Eredmények*

90 °C-on az L-Arg vagy a glükóz önmagában nem, de a kettő együtt ESR jelet adott, ami a görbe analízis szerint, a kölcsönható atomok figyelembevételével, pirazil vagy pirimidinil gyöknek felelt meg (26. ábra). A gyök keletkezésében a vas katalitikus szerepet játszik, mert a ferro és a ferri vas is növelte a gyökképződés sebességét, ugyanis 65 °C-on vas nélkül már nem tudtunk ESR jelet detektálni, vas jelenlétében azonban mérhető mennyiségű szabad gyök termelődését tapasztaltuk (27. ábra, piros). Amikor a ferri vasat a komplexképző dezferrioxaminnal stabilizáltuk, a gyökjel eltűnt, ami arra utal, hogy a reakció lejátszódásához ferri-ferro átalakulás szükséges (27. ábra). A gyök termelődésének hőmérséklet- és katalizátor-függését 65 és 90 °C között igazoltuk (27. ábra). A detektált gyök koncentrációból extrapolálva kimutatható, hogy az ESR metodika elméleti érzékenysége miatt testhőmérsékleten a reakciót ezzel a módszerrel igazolni nem tudjuk (28. ábra).

5.2.4.3. *Összefoglalás*

A NOS szubsztrátja, az L-arg glükóz jelenlétében glikálódik, a reakciót vas

katalizálja, ferri-ferro átalakulás szükséges hozzá, a reakcióban pirazil vagy pirimidinil szabad gyök keletkezik. A reakció hőmérséklet függő és az ESR érzéketlensége miatt testhőmérsékleten nem detektálható.

5.2.5. Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatása endotélsejtekre (tézis IX, publikáció 3)

A magas vérnyomás gyakori krónikus vesebetegségben (KVB) és jelentős rizikófaktora a vesefunkció romlásának, mely végül végstádiumú veseelégtelenséghez (VVE) vezethet (187). Az NO hiánynak nagy valószínűséggel szerepe van a veseelégtelenség következtében másodlagosan kialakuló magas vérnyomásban (293). Ezt támasztja alá a KVB-ben (263) és a VVE-ben szenvedő betegekben leírt csökkent teljes NO termelés is (264, 265).

Az NO sokhelyütt termelődik a szervezetben, és a vaszkuláris endotélsejtek által folyamatosan termelt NO-nak fő szerepe van az erek tónusának befolyásolásában, a vérnyomás és a vérátáramlás szabályozásában (202). Magas vérnyomás alakul ki az eNOS-gén hiányos egerekben (124). Magas vérnyomást és más kardiovaszkuláris szövődményeket írtak le emberben néhány (nem minden fajta) eNOS-gén polimorfizmusban (273, 292, 322). A NOS-gátló hatású arginin analógok plazmában történő felhalmozódása csökkent eNOS aktivitást eredményezhet, amint azt eredetileg Vallance és munkatársai is megfigyelték VVE-ben szenvedő betegeken (293). Továbbá leírták, hogy VVE-ben szenvedő betegek plazmája gátolja az eNOS aktivitást, amikor endotélsejt-tenyészetet inkubálnak vele, illetve, hogy ezekben a betegeken az ADMA szintek magasak (318).

Kíváncsiak voltunk, hogy a KVB-ben szenvedő betegek plazmájának is van-e eNOS-gátló hatása, ami hozzájárulhat a magas vérnyomáshoz. Ehhez HDMVEC sejtenyészetben vizsgáltuk, hogy van-e a plazmában olyan anyag, ami befolyásolja az endotél NO termelését (320 = 3).

5.2.5.1. Módszerek

Öt egészséges kontroll és 11 KVB-ben szenvedő betegtől (4 diabeteses /DM/, 2 obstruktív nephropátiás, ON, 1 IgA nephropátiás + szoló vesés, 1 szólóvesés, 1 fokális szegmentális glomerulonephritisben /FSGS/, 1 krónikus intersticiális nephritisben /KIN/ és 1 Wegener granulomatózisban szenvedő) gyűjtöttünk plazmát. A vérmintákat mindvégig hűtve kezeltük, heparinos csövekbe vettük, centrifugáltuk, kisebb mennyiségekre szétosztottuk és végül -80°C -on fagyasztottuk. A vérvétel és a fagyasztás közti időtartam

20 percen belüli volt, illetve a mintákat használat előtt közvetlenül olvasztottuk fel. A vesefunkció a betegekben hasonló volt: ~30%-a a normálisnak, amint ezt a plazma kreatinin és CN mutatja (3. táblázat).

Sejttenyészet: A HDMVEC sejteket és a tápfolyadékot (EGM-MV) a Clonetics Corporation (San Diego, CA)-tól vettük. A sejteket a 4-7. passzázs között használtuk. A tápfolyadék tartalmazott 10 pg/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktort, 1 µg/ml hidrokortizont, 50 µg/ml gentamicint, 50 ng/ml amfotericin B-t, 12 µg/ml marha agykivonatot és 5% fetális marhaszérumot. A sejteket konfluálásig 12 üregű sejttálcán tenyésztettük: 37°C-on, 95%-os páratartalom alatt, 5% CO₂ és 95% levegő atmoszférában, illetve a médiumot másnaponta cseréltük. A sejteket teszteltük von Willebrand faktor pozitivitás, acetilált LDL felvétel pozitivitása és simaizom α-aktin negativitás irányában, bizonyítva a tiszta endotélsejt kultúrát. Ezután a sejteket 6 órán keresztül MEM-oldattal inkubáltuk, mely 20% humán plazmát tartalmazott (vagy individuális plazmát a betegektől, vagy a normál kontrollok elegyített plazmáját). Korábbi kísérletek alapján a HDMVEC sejtek életképesek maradtak 6-12 órás 20%-os humán plazmával történő inkubáció során, de 24 órán túl a sejtek leváltak a tenyésztőedény aljáról, akkor is, ha kontroll plazma volt az inkubáló oldatban (318). A 6 órás inkubáció után használtuk a sejteket a NOS aktivitás és az L-arg transzport mérésekhez.

L-arg transzport és NOS aktivitás mérése: az 5.1.1. fejezetben ismertetett módon történt. Az L-arg transzport időfüggését HDMVEC-ben mutatja a 29. ábra. Mivel a [³H]-L-arg felvétele lineáris az első 5 percben, minden további kísérletben (mint ahogy az arterioloendothelium endotélsejtekénél is) 3 perces inkubációs időt alkalmaztunk

Külön sejteket tenyésztettünk T-75-ös flasksokban az intracelluláris L-arg meghatározásához és Western blot kísérletekhez. A konfluens sejteket 6 órán át egészséges kontrollok elegyített plazmájának (n=4), illetve KVE-ben szenvedők plazmájának (két csoport: normál és alacsony plazma NOS aktivitás alapján, mindkét csoportban n=3) 20%-os oldatával inkubáltuk. Az intracelluláris L-arg mérése az 5.1.1. pont alatt leírtak alapján történt, azzal a módosítással, hogy az oszlopot 41°C-ra fűtöttük.

Western blot-os kísérletek: szintén az 5.1.1. fejezetben taglaltakhoz hasonló módon történtek, azzal a kiegészítéssel, hogy iNOS izoenzimet is detektáltunk: nyúlban termelt elsődleges poliklonális antitestet (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, 1:200-as hígításban, 3 % zsírmentes tejport tartalmazó TBS-T oldatban, 1 órás inkubáció) használtunk, majd a membránt másodlagos antitest oldatban (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, kecskében, nyúl ellen termelt IgG-tormaperoxidáz konjugátummal,

1:2.000-es hígításban, 3 % zsírtmentes tejpórt tartalmazó TBS-T oldatban, 1 órán át) inkubáltuk.

A plazma ADMA- és SDMA-koncentráció mérése is reverz fázisú HPLC-vel, AccQ-Tag módszerrel történt, Schmidt és mkti szerint (26), Anderstam és mkti (8) nyomán. A heparinizált csőbe vett vért 2300 g-vel 15 percig centrifugáltuk 4°C-on, hogy plazmát nyerjünk, amit ultrafiltráltunk (10.000-es molekulásúly-küszöbvel), hogy eltávolítsuk a fehérjéket (12.000 g-vel, legalább 30 percig, 4°C-on). A szűrt plazmát -80°C-on tároltuk további felhasználásig. A mérés napján a mintákat szobahőmérsékleten olvasztottuk, AccQ Tag módszerrel vizsgáltuk. Standardnak ADMA, SDMA és L-NMA sorozathígításokat készítettünk a 0,625-10 µM-os tartományban, AccQ Fluor borát pufferben. Harminc µl mintát vagy standardot injektáltunk az oszlopra (Waters AccQ Tag, szilikon-alapú Nova-Pak C18, reverz-fázisú HPLC-oszlop) automata adagolóval. Duál pumpával vittük fel a mobil fázist (140 mM nátrium acetát 17 mM trietilaminnal, pH=5,05 és 60% acetonitril) 1 ml/perc-es sebességgel. Az eluált oldatot fluorescens módszerrel detektáltuk (excitáció: 250 nm, emisszió: 395 nm, erősítés: 100). A koncentrációkat Millenium Chromatography Manager v 2.1 (Waters Corp., Milford, MA) segítségével számoltuk. Az ADMA minimum detektálási küszöbe 0,15 µM, az SDMA-é 0,1 µM humán plazmában.

Minden vizsgálatot 3 alkalommal végeztünk el, és a kísérleteket legalább háromszor megismételtük.

Statisztikai módszerek: Student t-tesztet és ANOVA-t használtunk. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha $p < 0,05$. Az átlagot és a SE-t kalkuláltuk.

5.2.5.2. Eredmények

A kontrollok és betegek életkora (kontrollok: 58 ± 6 , betegek: 57 ± 4 év) és testfelszíne (kontrollok: $2,09 \pm 0,10$, betegek: $2,12 \pm 0,09$ m²) hasonló volt. A betegeknek szignifikánsan magasabb volt a szisztolés vérnyomása (3. táblázat), annak ellenére, hogy a legtöbb beteg antihipertenzív kezelésben részesült. A vesebetegség elsődleges oka különböző volt az egyes betegekben, de hasonló mértékű volt a vesefunkció-romlásuk (24 órás kreatinin klírensiz ~ 30%-a a normálisnak, 3. táblázat).

A 20%-os plazmával történő 6 órás inkubáció után a HDMVEC NOS aktivitást mutatja a 4. táblázat. A kontrollok értékeit átlagolva tüntettük fel, míg a betegekét individuálisan is. A kontrollok és a teljes betegcsoport átlag értékei között nem volt különbség NOS aktivitásban, bár a variancia nagy volt a betegcsoporton belül. Emiatt a

betegeket individuális statisztikai összehasonlítás alapján a kontrollok átlagával két alcsoportba osztottuk: alacsony (n=5) és normál NOS aktivitású beteg csoportra (n=6, p<0,05). A 30. ábra mutatja, hogy nem volt különbség a kontrollok és a teljes betegcsoport plazma ADMA koncentráció átlaga között, azonban az előbbi alcsoportok közül az alacsony NOS aktivitású alcsoport ADMA értékei szignifikánsan magasabbak voltak mind a kontrollokhöz, mind a normál NOS aktivitású csoport értékeihez képest. A plazma NOS aktivitása prediktív a plazma ADMA koncentrációt illetően, és ez vica versa is igaz. Ezzel ellentétben nem találtunk különbséget az SDMA értékekben a beteg-alcsoportok között, bár mindkét alcsoportban (együtt és külön is) szignifikánsan magasabb koncentrációkat mértünk, csakúgy, mint a plazma kreatinin és urea értékeket illetően. Így megállapítható, hogy a két beteg-alcsoport ADMA koncentráció különbségét elsődlegesen nem a vesefunkció romlása határozza meg. Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy növekvő ADMA koncentráció képes-e az eNOS aktivitást in vitro gátolni, HDMVEC sejteket inkubáltunk 6 órán át különböző koncentrációjú ADMA-t tartalmazó szintetikus oldatokkal, és azt találtuk, hogy a NOS aktivitást 2,5 μM ADMA szignifikánsan gátolta (p<0,05), míg 1 μM ADMA-nak nem volt ilyen hatása a kontrollhoz képest ($16,6 \pm 0,4$ vs. $18,8 \pm 0,8$ vs $19,8 \pm 0,7$ pmol/perc/mg fehérje). Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a a betegektől nyert plazma 20%-os hígítása miatt az ADMA szintje az inkubáló oldatban <1 μM , még a magas ADMA-jú csoportban is, ami arra utal, hogy a betegek plazmájában más eNOS-t gátló hatású anyag is jelen van.

Ahhoz, hogy láthassuk, hogy a NOS aktivitásban mutatkozó különbségek közül van-e olyan, aminek az oka az iNOS stimulációja, HDMVEC sejteket előinkubáltunk dexametazonnal (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 óráig), ami az iNOS transzkripciót gátolja (202). A dexametazon előkezelés kivédi az LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) + IL-1 β (100 U/ml) + IFN γ (100 U/ml)-indukálta iNOS aktivitást ezekben a sejtekben (nem közölt adatok). A 4. táblázat mutatja, hogy a dexametazon előkezelésnek nem volt befolyása egyetlen plazmaminta NOS aktivitást moduláló hatására sem.

Szintén nem volt különbség az L-arg transzportban HDMVEC sejtekben, 20%-os plazmával történő 6 órás inkubáció után a teljes betegcsoport (190 ± 19 pmol L-arg/perc/mg fehérje) vagy az egyes betegek, illetve a kontrollok között (198 ± 24 pmol L-arg/perc/mg fehérje). Az intracelluláris L-arg koncentrációt a következőképpen számoltuk: az L-arg tartalmat ($\mu\text{mol/g}$ össz sejt fehérje) sejttérfogatra konvertáltuk, feltételezve, hogy 1mg intracelluláris fehérje=6 μl intracelluláris víz (327). Az intracelluláris L-arg koncentráció 445 ± 28 μM volt a kontroll plazmával kezelt sejtekben, illetve hasonlóan ehhez, 510 ± 24

μM az alacsony NOS aktivitású beteg-alcsoportban, és kissé magasabb a normál NOS aktivitású beteg-alcsoportban ($578 \pm 33 \mu\text{M}$; $p < 0,02$ vs kontroll). A 31. ábra mutatja, hogy az eNOS fehérje Western blot analízise HDMVEC sejtekből nem mutatott eltérést egyik alcsoportban sem a kontrollokhöz képest (minden csoportban $n=3$). A PAGE gélekre való egyforma fehérjemennyiség felvitelét mind a β -aktin kimutatásával, mind a membránokra transzferált fehérjék Ponceau vörös festésével igazoltuk és erősítettük meg. Továbbá, az iNOS nem volt detektálható egyik sejtlizátumban sem, 6 órás inkubáció után.

5.2.5.3. Összefoglalás

A krónikus vesebetegség magas vérnyomással és a csökkent NO szintézissel járhat. KVB-ben szenvedő betegek plazmájában van olyan keringő faktor, ami gátolja a NOS aktivitást, és így direkt módon befolyásolja az endotéliumot. HDMVEC L-arg transzportját nem befolyásolta, míg NOS aktivitását gátolta azokból a KVB-ben szenvedő betegekből származó humán plazma 20%-os oldata 6 órás inkubáció után, akik plazma ADMA szintje is magasabb volt (megváltozott ADMA szintézist vagy csökkent lebomlást sejtetve). A plazma SDMA, kreatinin és urea koncentrációk magasabbak voltak a KVB-ben szenvedő összes betegben. Az eNOS enzim mennyiségét a HDMVEC-ben nem befolyásolta a 6 órás inkubáció. A magas koncentrációban jelen lévő ADMA részben felelős lehet az eNOS aktivitás gátlásáért endotélsejt tenyészetben, de in vivo is csökkent eNOS aktivitáshoz is vezethet, következményes hipertóniával.

5.2.6. Az urea hatása endotélsejtek L-arg transzportjára és NOS aktivitására (tézis X, XI, XII, **publikáció 4, 30**)

Ahogy korábban emítettük, VVE-ben szenvedő betegekben hiányzik, vagy jelentősen csökkent a működő veseállomány, illetve a NOS által használt endogén L-arg fő forrása a vesekéreg (248). Bár a VVE-ben szenvedő betegek plazma L-arg koncentrációja általában a normálérték alsó határán van (264, 265), az értékek még mindig jelentősen az eNOS enzim K_m -je felett vannak (51). Így, a VVE-et nem tekinthetjük teljesen az NO termelés szubsztrát-hiány miatti következményének, hacsak a plazma L-arg nem tükrözi az intracelluláris L-arg hozzáférhetőséget, például a sejtekbe történő csökkent L-arg transzport miatt.

Kimutattuk, hogy VVE-ben szenvedő betegek plazmája gátolja az L-arg transzportot endotélsejtekbe in vitro. Ezután különféle szintetikus oldatokat használtunk, hogy megkereshessük, az urémiás plazma mely alkotórészei felelősek az L-arg transzport

gátlásáért. Így vizsgáltuk az urémiásokban előforduló koncentrációjú urea hatását is, rövid (6 óra) és hosszú (7 nap) ideig tartó inkubáció során is. Kísérleteink nagy részét HDMVEC sejteken végeztük, de használtunk HGEC és BTAEC sejteket is.

5.2.6.1. Módszerek

Az 5. táblázat mutatja a betegek néhány klinikai és biokémiai jellemzőjét, akiktől a kísérletekhez a plazmát nyertük. További, a betegekkel kapcsolatos információ Schmidt és mkti, (264, 265) munkáiban olvasható. A hemodializált betegeket poliszulfon membránnal kezelték (high flux, F-80, Fresenius USA, Lexington, MA, USA). A vérmintákat heparinos csövekbe gyűjtöttük, majd 20 percen belül 4°C-on centrifugáltuk, szétosztottuk és fagyasztottuk (-80°C-ra), illetve használat előtt közvetlenül felolvasztottuk.

Sejtenyészet: HDMVEC 4-7. passzázs közötti (Clonetics Corp. San Diego, CA, USA), HGEC 4-7. passzázs közötti (Cell System Corp. Kirkland, WA, USA) és BTAEC 2-4. passzázs közötti (általunk tenyésztett) sejtekkel dolgoztunk. A HDMVEC és HGEC sejtek tenyésztése az 5.2.5.1. fejezetben ismertetettek szerint történt. A BTAEC sejteket DMEM-10 médiumban tenyésztettük. A 20%-os plazma elkészítésére vonatkozó leírást is az 5.2.5.1. fejezetben írtuk le, azzal a különbséggel, hogy itt a kontrollok mellett VVE-ben szenvedő betegekből nyertük a vért, KVB-ben szenvedők helyett. Továbbá szintetikus oldatokat is készítettünk a 6 órás inkubációkhoz.

L-arg transzport: lásd az 5.1.1. fejezetet. Rutinszerűen végeztünk paralell kísérleteket L-NMA (2 mM), az L-arg kompetitív antagonistájának (a kationos aminosav transzportereken; 46) hozzáadásával. Először 20%-os humán plazmával (kontrollokból és VVE-ben szenvedőkből) inkubáltuk, 6 órán át, mindhárom sejtípus sejtjeit, majd HDMVEC sejteket használtunk a szintetikus oldatokkal történt kísérletekben, ahol először azt vizsgáltuk, hogy van-e a különböző komponenseknek azonnali, kompetitív gátló hatása a transzportra. L-NMA mellett L-NAME-et (2 mM), ami nem a kationos aminosavtranszporterén keresztül jut a sejtbe (46); ADMA-t (2,5, 10 és 100 µM), D-arg-t (2 mM) és urémiásokban előforduló koncentrációban ureát, továbbá lizint (2 mM), ami kationos aminosav (így kompetitív inhibitor) is használtunk. Ezeket az anyagokat közvetlenül az esszé pufferbe kevertük (előinkubáció nem történt), hogy láthassuk, az L-arg transzportot mi gátolja kompetitíve.

A kompetitív vizsgálatok mellett kiterjedt vizsgálatokat végeztünk szintetikus oldatokkal 6 órás előinkubáció után. A szintetikus oldatok alapját a következő anyagok képezték: 117 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 26,2 mM

NaHCO₃, 1,0 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM D-glükóz és 20% FBS. Néhány kísérletben urémiásokban előforduló ADMA koncentrációt használtunk (2,5 μM), de a kísérletek többségében az urea különböző koncentrációinak hatását vizsgáltuk. Az “urémiás” médium 50 mM ureát és 5,5 mM D-glükózt, vagy 25 mM ureát és 30,5 mM D-glükózt (311 mosm/l), a “kontroll” médium 55,5 mM D-glükózt és ureát nem tartalmazott (308 mosm/l). Főleg L-arg transzportot mértünk, de néhány esetben NOS aktivitást is.

Vizsgáltuk az urea koncentrációfüggő hatását is az L-arg transzportra: 1, 5, 15 and 25 mM-os koncentrációban. Néhány kísérletben aminosavakkal egészítettük ki az inkubáló tápfolyadékot, hogy utánozzuk az urémiás plazma profilt (0,025 mM L-cit, 0,10 mM L-arg, 1,0 mM L-gln, 0,2 mM L-lizin, 0,5 mM L-glicin, 0,1 mM L-cisztein) az 50 mM urea oldatban, vagy a normál plazma profilt (0,05 mM L-cit, 0,10 mM L-arg, 0,75 mM L-gln, 0,2 mM L-lizin, 0,25 mM L-glicin, 0,05 mM L-cisztein) az 55,5 mM-os D-glükóz oldatban (79).

Az akut, 6 órás kísérletek mellett végeztünk krónikus inkubációs kísérleteket is HDMVEC sejteken. Vagy 25 mM ureát vagy 25 mM mannitolt (mint ozmotikus kontrollt) adtunk a reguláris médiumhoz (mely 20% FBS-t tartalmazott), amiben 7 napig tartottuk a sejteket (a médiumot másnaponta cseréltük), majd ezután mértük az L-arg transzportot és az eNOS aktivitást.

Végül, BTAEC sejteket T-75-ös flaskákban tenyésztve mértük az intracelluláris L-arg koncentrációt (a mérés részletes leírását lásd az 5.1.1. fejezetben, azzal a kivétellel, hogy MEM-mel nem történt itt előinkubáció) és az eNOS enzim mennyiségét Western blot-tal (a mérés részletes leírását lásd szintén az 5.1.1. fejezetben). A konfluáló BTAEC sejteket 6 óráig vagy 30,5 mM D-glükózt, vagy 25 mM ureát + 5,5 mM glükózt tartalmazó mediával inkubáltuk. A krónikus (7 nap) vizsgálatokhoz a BTAEC sejteket szintén T-75 flaskákban tenyésztettük (~300.000 sejt/flaska kezdeti sejtszámmal), majd 24 óra múlva a reguláris tápfolyadékot vagy 25 mM ureával, vagy 25 mM mannitollal (másnapenkénti cserével) kiegészített tápfolyadékokra cseréltük, 7 napig.

Statisztika: Az esetszám különböző volt az egyes kísérletekben, de minden esetben legalább 3 mérés történt. Az átlagot és a SE-t kalkuláltuk. Student t-tesztet és ANOVA-t használtunk. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha $p < 0,05$.

5.2.6.2. Eredmények

A 32. ábra felső panelje foglalja össze különböző humán plazmák hatását az L-arg transzportra HDMVEC-ben. VVE-ben szenvedő betegekből származó, 20%-os plazmával

történt, 6 órás inkubáció az L-arg felvételét szignifikánsan gátolta mind a PD (peritoenalis dializált), mind a pre-HD (HD=hemodializált) csoport plazmája, kontrollhoz képest ($p < 0,01$), és nem volt különbség a PD és pre-HD plazma hatása között. A HD kezelés részben eltávolította az urémiás plazma L-arg transzportot gátló faktor(oka)t, mivel hatásban a poszt-HD csoportban különbség volt a pre-HD csoporthoz képest ($p < 0,05$), de még mindig a kontroll szintje alatt maradt a transzport mértéke ($p < 0,05$). A dializáló membrán jellemzői alapján a kismolekulasúlyú és néhány közép-molekulasúlyú anyag gyors klírenszt vártuk volna. Hasonlókat tapasztaltunk HGEC és BTAEC sejtekben is (32. ábra, középső és alsó panelek). Minden esetben az L-arg transzportot L-NMA nagyrészt megakadályozta (kontroll és urémiás plazma hozzáadása után, üres oszlopok).

A 33. ábra mutatja számos anyag közvetlen, kompetitív hatását az L-arg transzportra. HDMVEC-ben az L-NAME (az L-NMA-hoz hasonló) teljesen hatástalan volt az L-arg transzport gátlásában, aminek oka, hogy az L-NAME főként neutrális aminosav transzportert használ a sejtekbe történő jutáshoz (46) és ez a neutrális aminosav transzporter hiányozhat endotélsejtekből. Az ADMA-nak volt némi gátló hatása az L-arg transzportra farmakológiai koncentrációban (0,1 mM), de abban a tartományban nem, ami rendszerint előfordul urémiában (2,5 μ M or 10 μ M). A D-arg-nak nem volt gátló hatása, de a kationos aminosav L-lizinnek igen (77). Az ureának (25 mM) sem volt kompetitív hatása az L-arg transzportra. Mivel szükség volt a 6 órás inkubációra ahhoz, hogy a humán plazma kifejtse az L-arg transzportra a hatását, hasonló előinkubációs időt alkalmaztunk a szintetikus oldatoknál is. Az L-arg transzportot nem befolyásolta 2,5 μ M ADMA, kontrollhoz képest (294 ± 13 vs 291 ± 20 pmol/perc/ mg protein). Ezzel szemben, az urea (25 mM és 50 mM) a 6 órás inkubáció során, szignifikánsan és egyforma mértékben gátolta az L-arg transzportot HDMVEC-be (kontroll: equimoláris D-glükóz, 34. ábra). Hasonló hatást tapasztaltunk akkor is, amikor a szintetikus médiumok tartalmazták az urémiás vagy normál állapotra jellemző aminosavprofil (adatokat nem mutatjuk). Az L-NMA nagyrészt gátolta (>90%) a transzportot (üres oszlopok). Az urea (25mM) szintén gátolta az L-arg transzportot HGEC és BTAEC sejtekben (34. ábra). Külön kísérletben, BTAEC-ben azt tapasztaltuk, hogy 1 és 5 mM-os koncentrációban nem volt hatása az ureának, míg 15 és 25 mM-os koncentrációban hasonló gátló hatást fejtett ki (35. ábra). Hét napig tartó inkubáció 25 mM ureával, ugyanolyan L-arg transzport gátlást eredményezett, mint a 6 órás (6. táblázat).

Szintén vizsgáltuk a nagy urea koncentráció hatását a NOS aktivitásra. Amint azt a 6. táblázat is mutatja, 25 mM ureával történt 6 órás inkubációnak nem volt hatása az eNOS

aktivitásra HDMVEC, HGEC vagy BTAEC sejtekben, míg HDMVEC-ben 7 nap után gátolta a NOS aktivitást 25 mM urea. Ezek a hatások a 7 napos inkubáció során az L-arg transzportra és eNOS aktivitásra az ureának tulajdoníthatók (34. ábra, 6. táblázat), mivel hasonló mértékű ozmolaritás-változás mannitollal a médiumban nem okozott változást sem az L-arg transzportban, sem a NOS aktivitásban a kontrollhoz viszonyítva (228 ± 27 vs 217 ± 18 pmol L-arg transzportálva /min/mg protein és $17,4 \pm 1,1$ vs $16,1 \pm 1,1$). Nem változott az L-arg koncentrációja 6 óra alatt 25mM urea hatására, bár 7 nap után magasabb volt az ureával kezelt sejtekben, mint a kontrollokban, talán tükrözve ezzel a NOS csökkent L-arg fogyasztását. Western blot analízissel kimutattuk, hogy az eNOS enzim mennyisége (β -aktinhez viszonyítva) nem változott sem 6 óra, sem 7 nap után 25mM urea vs kontroll hatására ($0,89 \pm 0,11$ vs $0,89 \pm 0,32$ és $1,05 \pm 0,35$ v $1,07 \pm 0,32$ integrált optikai denzitás egységek). Az 36. ábra egy reprezentatív Western blot-ot mutat be.

5.2.6.3. Összefoglalás

Urémiásokból (PD kezelt betegekből és HD kezelés előtt) nyert plazma (20%-ban adva szintetikus médiumhoz, 6 órás inkubáció után) gátolta az L-arg transzportot endotélsejt-tenyészetben: HDMVEC-ben, HGEC-ben és BTAEC-ben is. A HD kezelés részlegesen kivédte a gátló hatást. HDMVEC sejteket 6 óráig inkubálva, ureát urémiás koncentrációban tartalmazó szintetikus médiummal, szintén L-arg transzport gátlás volt megfigyelhető, de a gátló hatás nem volt kompetitív jellegű, mivel akut hatásban az urea nem befolyásolta a transzportot. A 6 órás inkubációs idő ureával nem volt elég ahhoz, hogy a NOS aktivitást is gátolja a sejtekben, azonban 7 nap inkubáció után már csökkentette azt is. Ezek a megfigyelések felvetik, hogy az eNOS enzim szubsztrát ellátása csökkenhet, így az enzim aktivitása is gyengülhet, ami hozzájárulhat a magas vérnyomás kialakulásához VVE-ben szenvedő betegeknél.

5.3. Az L-arg - NO útvonal in vivo vizsgálata állatokban - az urea hatása (tézis XIII, XIV, XV, *publikáció 5*)

Az urea a fehérjemetabolizmus végterméke, mely a májban termelődik, és melyet a vese választ ki (204). Normál vesefunkció esetén az urea koncentrációja a vérben alacsony, azonban, amikor veseelégtelenség alakul ki, az urea és más oldott anyagok is kisebb mértékben választódnak ki, azotémiát, majd urémiát okozva. Bár a magas urea koncentrációt inkább tekintették a vesefunkció romlást jelző markerének, mint urémiás

toxinnak, egyre több bizonyíték szól amellett, hogy az urea képes rossz irányban befolyásolni számos sejtfolyamatot (122). Például, az urea, urémiásokban előforduló koncentrációban gátolja a Na⁺-K⁺-ATPáz-t, a NaK₂Cl kotranszportert, az iNOS aktivitást, és más enzimeket is (174, 200, 223, 232, 243). Emellett, az urea, az 5.2.6. fejezetben ismertetettek szerint urémiásokban előforduló koncentrációban (25 mM) szignifikánsan gátolja az L-arg transzportot endotélsejt tenyészetbe 6 órás inkubáció után, illetve gátolja e sejtek NOS aktivitását 7 napos inkubáció után. Mivel hasonló megfigyeléseink voltak VVE-ben szenvedő betegekből nyert plazmával, feltételezhető, hogy urémiában a magas urea szint általánosan gátolja az L-arg transzportot endotélsejtekbe. Hogy ennek az in vivo jelentőségét is láthassuk, krónikusan etettünk egészséges patkányokat magas urea tartalmú diétával, hogy urémiában előforduló plazma urea szinteket kapjunk. Mértük a vérnyomást, a vesefunkciót mind a diétás periódus előtt (kontroll), mind 7 napos etetés után, amikor az NO rendszert is vizsgáltuk, akut NOS gátlással. Mértük továbbá az urea-etetés hatását a teljestest NO termelésére, a 24 órás vizelettel történő NO₂ + NO₃ (NO_x) kiválasztás alapján; a NOS aktivitást a vesekéregben és a kisagyban; illetve a NOS enzim mennyiségét a vesében.

5.3.1. Módszerek

Kísérletes állatok: 14 hím Sprague-Dawley patkányt (3-5 hónapos) vásároltunk a Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, Inc (Indianapolis, IN, USA) cégtől. A patkányokat alacsony nitrát tartalmú diétán tartottuk (ICN-AIN76C diéta, ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA, USA; NO_x tartalom: 125 μmol / kg) végig a kísérlet során.

Huszonnégy órás vizeletgyűjtés után, 6 állatot krónikus hólyag- és vaszkuláris kanülökkel láttunk el (24, 25, 26, 238, 282). Az állatok előkészítése: A kanülálást teljesen steril körülmények között végeztük, általános anesztéziában, rövidhatású barbituráttal, Brevital-lal (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN, USA). A kezdeti dózis 50 mg/kg iv, volt, majd a továbbiakban 5-10 mg/kg iv fenntartó dózist adtunk szükség esetén. Tygon kanüloket helyeztünk az abdominális aortába és a vena cava inferiorba, a bal femorális artérián és vénán keresztül, amiket a bőr alatt vezettünk el (16G-s trokárral) és a nyak hátsó részén vezettünk ki a bőr alól. A kanüloket 1:1 arányú heparin (1000 IU/ml) és dextróz (50%) keverékkel töltöttünk fel, a kanülök végét rozsdamentes acéltűvel zártuk. A hólyagkanült szuprapubikus incízióból vezettük be, amit ezután neomycin-oldattal töltöttünk fel, és silastic műanyaggal fedett rozsdamentes acéltűvel zártuk, hogy a patkány normális úton ürítse a vizeletét a kísérletmentes periódusokban. Az állatokat treníroztuk

a kanülökkel való vizsgálatokhoz, és ahhoz, hogy órákig nyugodtan üljenek a kísérleti ketrecben.

Legalább 7 nappal később, a sebgyógyulás után, végeztük a kontroll méréseket (normál urea szintnél): vérnyomásmérést és vesefunkciós vizsgálatokat. Ezután kaptak az állatok folyamatosan alacsony nitrát tartalmú diétát, amelyet 30% ureával egészítettünk ki. A patkányok 12 óránként kaptak 20-20 g táplálékot egy hétig, amit el is fogyasztottak (ekvivalens 5 $\mu\text{mol NO}_x$ / 24 óra bevitellel). A módszer egy korábban leírt protokoll adaptációja, amelyben az urea etetés magas plazma urea szinteket eredményez egészséges állatokban (223). Az etetés 5-6. napján 24 órás vizeletgyűjtés történt az ureával táplált állatokon, majd 24 óra múlva végeztük el vesefunkciós vizsgálatokat, amikor is kontroll vérnyomást és vesefunkciót mértünk, majd akut, szisztémás NOS gátlást követően is (lásd lejjebb), végül az állatok eutanáziája után megvizsgáltuk a hólyagot és a veséket, hogy nincs-e bennük fertőzés.

A vesefunkciós mérések a következők voltak: glomeruláris filtrációs ráta (GFR) és renális plazmaáramlás (RPF), inulin és para-aminohippursav (PAH) klírens, átlag vérnyomás (RR) mérése, illetve a nátrium kiválasztás mérése (U_{NaV}). A filtrációs frakciót (FF) és a renális vaszkuláris rezisztanciát (RVR) számoltuk. A kontroll (normális urea szint) mérések után (két klírens mérési periódus átlaga) kezdődött az állatok etetése az ureával kiegészített táplálékkal. Hét nappal később megismételtük a vesefunkciós méréseket (alapállapot, magas urea szint), és végül akut szisztémás NOS gátlás mellett is (iv L-NAME, 10 mg/kg; szupramaximális presszor dózis; 26). A kísérletes protokoll, méréstechnikák és számolások további részletei korábbi publikációk alapján történtek (24, 25, 238, 282).

A NO_x mérése a 24 órás vizeletből Sütő és mtsai alapján (282) történt a Griess módszer alkalmazásával. Az módszerben a nitrát reduktáz enzim a NO_3 -ot NO_2 -té redukálja. Az enzimet *E. coli* anaerob tenyészetből nyertük, nitrát reduktázt indukáló médium segítségével, 14 órás inkubáció során. A termelt NO_2 -et és az enzim által redukált NO_3 -ot a Griess reakcióval határoztuk meg. 125 μl minta és 100 μl HEPES/ammónium keverékéhez 25 μl nitrát reduktáz enzimet adtunk, kevertük, majd 60 percig inkubáltuk 37°C-os keverős vízfürdőn. Ezalatt a NO_3 -ot NO_2 -té redukálja az enzim, ahogy ezt a NO_3 standardok teljes konverziójából is láthattuk. Az inkubáció után a mintákat 2000 rpm-mel, 15 percig centrifugáltuk. A felülúszóból 100 μl -t adtunk a Griess-reagenshez (1:1, V/V keverék formájában; Griess-reagens: 1,0% szulfanilamid 0,1% naftiletilén diaminban) 96-üregű tálcán, majd 10-15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az abszorbanciát 543 nm-

en határoztuk meg spektrofotometriásan. A koncentrációkat a ismert nátrium nitrit koncentrációkat (5-500 μM) tartalmazó standard görbéről (a lineáris tartományban) extrapoláltuk.

A vizelettel ürített fehérjemennyiség meghatározását a Bradford módszer (50) szerint végeztük. A protein jelenléte esetén színváltozással járó spektrofotometriás módszer lényege, hogy a Coomassie Brilliant Blue-G-250 festék (foszforsav és metanol keverékében, BioRad, Richmond, CA, USA) abszorbancia maximuma savanyú oldatban 465 nm-ről 595nm-re tolódik, ha fehérje kötődik hozzá. Ez a módszer szolubilizált proteinek egyszerű és pontos meghatározását teszi lehetővé. A módszer: marhaszérum albuminból 4 standard oldatot készítettünk, sorozathígítással (62,5-500 $\mu\text{g/ml}$). A módszer lineáris 3,25 $\mu\text{g/ml}$ és 125 $\mu\text{g/ml}$ között. Száz-száz μl festékoldatot (5x-ös hígításban), majd 10-10 μl standard oldatot vagy mintát, végül ismét 100-100 μl festékoldatot pipettázunk 96-üregű tálcára, duplikátumban, majd keverjük, és legalább 5 perces, de maximum 60 perces, szobahőmérsékleten történő inkubáció után spektrofotometriásan, 595 nm-en mérjük az abszorbanciát. A fehérjekoncentrációt a standard görbéről számítógép extrapolálja.

A plazma urea szintet a #640-es Sigma kit-tel mértük.

Az állatok egy további, 4 fős csoportját szintén magas urea-tartalmú diétán tartottuk 7 napig, majd felboncoltuk őket, és szöveteket excindáltunk, amiket azonnal lefagyasztottunk és -80°C -on tároltuk a későbbi in vitro kísérletekig, ahol 4 alacsony NO_x diétán tartott kontroll patkány szöveivel hasonlítottuk össze.

A következő mérések történtek: L-arg koncentráció meghatározása aorta és vesekéreg szövethomogenizátumokban, ennek részletes leírását lásd az 5.1.1. fejezetben, azzal a különbséggel, hogy itt a sejtlizátum helyett 0,9% NaCl-oldatban homogenizált szöveteket használtunk.

Továbbá, NOS aktivitást mértünk kisagyszövetből és vesekéregből. Jéghideg homogenizáló oldatból (231) ötszörös mennyiséget adtunk (a szövet tömegéhez viszonyítva), homogenizáltunk, majd ultrahanggal 1 percig szonikáltunk. A mintát ezután 100.000 g-vel, 60 percig 4°C -on centrifugáltuk, hogy elkülöníthessük a szolubilis és membrán frakciókat (51). Az endogén L-arg-t eltávolítottuk: Dowex gyanta (Na-forma) desztillált vizes 1:1 arányú elegyével kevertük és centrifugáltuk 1.370 g-vel 3 percig 4°C -on. Az endogén L-arg-mentes membrán frakció elkülönítéséhez az üledéket reszuszpendáltuk 5 ml homogenizáló pufferben, majd centrifugáltuk 100.000 g-vel 60 percig 4°C -on, és az üledéket ismét reszuszpendáltuk 1 ml homogenizáló pufferben (272). A NOS aktivitást az L- ^3H -arg L- ^3H -citrullin konverzió mértékéből számoltuk ki (51,

kisebb módosításokkal). Szolubilis vagy membrán frakciót preparáltunk, amikben a különböző anyagok végkoncentrációja a következőképpen alakult: 25 mM TrisHCl, 1,25 mM kalcium klorid, 1 mM NADPH, 15 nM L-[³H]arg, 5 μM L-arg, 1,09 μM flavin adenin dinukleotid (FAD), 1,09 μM flavin mononukleotid (FMN), 0,33 mM tetrahydrobiopterin (BH₄), 0,11 μM kalmodulin és 1,09 μM ditiotreitól. Argináz-gátlókat is adtunk az elegyhez: 10 mM valint és 10 mM L-pro-t, a vesekéreg esetében. Minden mintából 2x3 mérést végeztünk: 3-at alapállapotban, 3-at vagy nem-szelektív NOS-gátlókkal (L-NMA, 10 mM és L-NAME, 20 mM) a vese esetén, vagy N-ω-nitro-L-arginin (L-NNA)-val (2 mM) a cerebellum frakcióknál. Az inhibitorokkal 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten, majd L-arg-nel inkubáltuk a mintákat 45 percig 37°C-os keverős vízfürdőn. A reakciót 400 μl jéghideg stop-pufferrel állítottuk le (5 mM EDTA és 50 mM HEPES, pH=5,5), majd 400 μl 50%-50% desztillált víz - AG50W-X8 Dowex gyanta keverékét (Na-forma) adtuk minden egyes minához. Öt perc keverés után 3.100 g-vel 3 percig 4°C-on centrifugáltuk az oldatokat, majd a felülúszó 500 μl-ét 4 ml Optifluor szcintillációs folyadékban kevertük el, és Packard szcintillációs számlálóval számláltuk. Az adatokat pmol konvertált [³H]L-cit/perc/mg fehérje formában fejeztük ki, és korrigáltuk a háttéraktivitásra. A háttér hőinaktivált mintákkal mértük (60 perces inkubáció 80°C-on). A háttér standardot a nem konvertált [³H]L-arg Dowex-gyantával történt eltávolítása után határoztuk meg; melynek értéke <5%-a a 100%-os standardnak. A háttér standard szabad trícium vagy nem-kationos trícium-tartalmú molekulák oldata, amiket a Dowex gyanta nem kötött meg. A 100%-os standard elkészítése: 200 μl desztillált víz a Dowex gyanta helyett, ez reprezentálja a teljes konvertálható mennyiséget.

Az eNOS, nNOS és β-aktin fehérjéket vesehomogenizátumokból mutattuk ki, Western blot segítségével. A módszer részletes ismertetése az 5.1.1. fejezetben található. Kiegészítésként megemlítendő néhány módosítás. A sejtoldatok helyett itt szövethomogenizátumokat használtunk Ezeket fagyasztott szövetek 4°C-os lízis pufferben (1mg / 5 μl) történt homogenizálásával, majd 10 percig 10.000 g-vel 4°C-on történt centrifugálásával állítottuk elő. Továbbiakban a felülúszót használtuk, az említett fejezetben leírtak szerint. Az eNOS kimutatásához 1:250 hígításban alkalmaztuk az elsődleges antitestet. Az eNOS kimutatása után a membránokhoz kötött antigénekről (fehérjékről) eltávolítottuk az antitesteket, ahogy azt az 5.1.1. fejezetben is említettük. Az nNOS kimutatásához a membránokat 1 órás blokkolás után (5%-os zsírmentes tejfehérjeoldat TBS-T-ben) nyúlban termelt poliklonális primér antitest-oldattal kezeltük (a patkány nNOS N-terminusa (231 aa) ellen termelt antitest, Dr. Kim Lau, UT Dallas, TX, USA ajándéka):

1:5.000-es hígításban, 5%-os zsírmentes tejfehérjeoldat TBS-T-ben, 1 óráig inkubációval szobahőmérsékleten. Ezután másodlagos antitest-oldattal (kecskében termelt, nyúl elleni, IgG-tormaperoxidáz konjugátum, BioRad, Richmond, CA, USA) 1:3.000-es hígításban 5%-os zsírmentes tejfehérjeoldat TBS-T-ben, 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az ismételt antitest-mentesítés után a membránokon a β -aktint is kimutattuk (lásd szintén az 5.1.1. fejezetet).

Statisztika: Az átlagot és a SE-t kalkuláltuk. Egymintás, párosított Student t-próbát használtunk a kezelés előtti és utáni értékek (normális és magas plazma urea szintek) és az alap és akut NOS-gátlás eredményeinek összehasonlítására. Kétmintás Student t-próbát alkalmaztunk az in vitro mérések esetén. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha $p < 0,05$.

5.3.2. Eredmények

Amint a 37. ábra mutatja, a plazma urea szint az ureában gazdag diéta 3. napjára stabilan magas értékre emelkedik. A diéta 7. napjára a plazma urea szintje kb. ~ 4-szerese a normál kontroll értéknek (7. táblázat).

A 24h U_{NOX} V, mint a teljes test NO termelésének mutatója, nem csökkent 7 nap nagyfokú ureabevitel mellett sem, sőt némileg emelkedett is (7. táblázat). A diétával bevitt NO_X mennyisége állandó volt (5 μ mol /24h), mivel a tápcsatornából a NO_X -nak csak 50–70%-a kerül a szervezetbe, és mivel a NO_X ürítés a vizeletben mindig meghaladta a bevitelt, ezért a teljes NO termelésnek emelkedni kellett urea etetés hatására. A 24 órás fehérjeürítés szintén emelkedett (7. táblázat).

Az egy hétig folyamatosan magas plazma urea szint nem befolyásolta az átlag vérnyomást, a renális vaszkuláris rezisztenciát, a renális plazmaáramlást vagy a GFR-t (7. táblázat). A vizelet osmolaritása azonban jelentősen megemelkedett, míg a vizelettel történt Na ürítés csökkent. A 38. ábra mutatja, hogy az ureával etetett állatokban a NOS inhibitor L-NAME akut szisztémás adása szignifikáns RR emelkedést eredményezett, a RVR jelentős megemelkedésével (és RPF csökkenéssel, a táblázatban nem szerepel) és szerény GFR csökkenéssel együtt. Ezek a változások hasonlóak azokhoz a hemodinamikai válaszokhoz, amiket normál kontroll állatokban figyelhetünk meg, ugyanezzel a módszerrel (25, 26, 238). Az egyetlen különbség L-NAME adásakor a magas urea szintű állatok és a kontroll állatok között az, hogy míg normál állatokban növekedést figyeltek meg a nátrium kiválasztásban, (38. ábra), addig ezt a hatást nem látták ureával etetett állatokban (25, 26, 238).

A 8. táblázatban látható, hogy a vesekéreg L-arg koncentrációja hasonló volt kontroll és ureával etetett állatokban. Az eNOS és nNOS mennyisége (a β -aktinhez viszonyítva) a vesekéregben szintén hasonló volt a két csoportban. A 39. ábra eNOS reprezentatív Western blot-ot szemléltet. Továbbá, a vesekéreg szolubilis frakciójának NOS aktivitása is hasonló volt a kontroll és kezelt állatokban (8. táblázat). Mivel az L-NMA + L-NAME kombináció ~90%-ban gátolta az L-arg - L-cit konverziót, ezért ez az aktivitás a NOS enzim jelenlétére utal mindkét csoportban. A cerebellum NOS aktivitását is mértük (a veséhez képest nagyobb NOS aktivitású szerv), ahol szintén, mind a szolubilis, mind a membrán frakciókban hasonló aktivitást tapasztaltunk (29 ± 7 vs 35 ± 4 , és 13 ± 2 vs 11 ± 1 pmol cit/perc/mg fehérje), és amit az L-NNA ugyanolyan mértékben gátolt mindkét csoportban, átlag $99,2 \pm 0,3\%$ -kal.

5.3.3. Összefoglalás

Az előző fejezetben láttuk, hogy magas urea koncentráció egy hét alatt csökkenti az L-arg transzportot és a NOS aktivitást endotélsejtekben in vitro. Megvizsgáltuk, hogy 7 napig tartó magas urea bevitel és következményesen magas plazma urea szint in vivo befolyásolja-e a vesehemodinamikát, vérnyomást és az NO rendszert. Egészséges patkányokat 7 napig alacsony nitrát- és 30% urea tartalmú diétán tartva megemelkedett a plazma urea szint ($5,4 \pm 0,4$ -ről $24,6 \pm 1,4$ mM-ra, $p < 0,001$). A magas plazma urea szint nem csökkentette a 24 órás NO_x ürítést (mint a test teljes NO termelésének mutatóját). A vérnyomást és a vesehemodinamikát nem befolyásolta a magas urea szint, csakúgy, mint a presszor és vazokonstriktor válaszokat sem, L-NAME hatására. Emellett nem volt hatással a vesekéreg L-arg koncentrációjára, az eNOS, vagy az nNOS enzim mennyiségére, illetve a vesekéreg és a cerebellum NOS aktivitására sem. Következésképpen, a magas plazma urea koncentráció nem okozott vazokonstriktiót vagy NO hiányt normál vesefunkciójú egészséges patkányokban.

5.4. Humán vizsgálatok – IgA nefropátia és hipertónia (tézis XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, publikáció 1, 2, 9, 18, 19, 21, 23, 24, 32, 33, 37)

Az IgA nefropátia a primer glomerulonephritisek azon csoportja, melyre elsősorban a glomerulusok mesangiumában megfigyelhető IgA lerakódás jellemző. (261) Hasonló jellegű szövettani elváltozások néhány szisztémás betegségben (Henoch-Schönlein purpura, májbetegség, SLE stb.) is megfigyelhetők.

Az IgA nefropátia diagnózisa csak vesebiopsziával állítható fel. A diagnózis diffúz,

elsősorban mezangiális elhelyezkedésű, dominálón IgA típusú immunglobulin depozitumok immunhisztokémiai kimutatása alapján történik. Az IgA depozitumokhoz hasonló elhelyezkedéssel szinte minden esetben megfigyelhető C3 komplement illetve 50-70 %-ban IgG jelenléte is. Fénymikroszkópos vizsgálattal az esetek többségében a diffúz vagy gócos mezangiális proliferáció a jellemző kép, de ritkábban a glomerulusokban adhézió, szegmentális szklerózis illetve crescent képződés is megfigyelhető. A tubulointerstitialis elváltozások nem specifikusak a kórképre (tubularis atrófia, intersticiális kereksejtes beszűrődés és fibrózis), de a betegség progresszióját a tubulointerstícium érintettsége jelentősen befolyásolja. (47)

Patogenezis: Az IgA immunglobulinok granulált jellegű glomeruláris lerakódása illetve a szérumban mért magasabb IgA és IgA immunkomplex szintek alapján feltételezhető, hogy a kórkép kialakulásáért az immunrendszer IgA típusú immunválaszának sérülése felelős.

Klinikai kép: Az IgA nefropátia leggyakoribb tünete a mikroszkópos hematuria (az esetek 60 %-ban) és/vagy enyhe proteinuria (<1g/nap), valamint az infekciót követő átmeneti makroszkópos hematuria (az esetek 35 %-ban). (261) Az enyhe hematuria illetve proteinuria leggyakrabban szűrővizsgálat vagy egyéb alkalmassági vizsgálat (pl. sorozás, munkavállalás, véradás, jogosítvány kérelem) során kerül felismerésre. Ezért a betegség pontos kezdete legtöbb esetben nem határozható meg. A makroszkópos hematuria leggyakrabban felsőlégúti fertőzés kezdetétől számítva 1-3 napon belül alakul ki, de számos virális (hepatitis A/B, rubeola, EBV, herpes zoster stb.) infekció, bakteriális eredetű gastroenteritis, arthritis, erysipelas stb., illetve fizikai behatás (tonsillectomia, appendectomia, fog extractio stb.) és immunológiai (vakcináció, BCG oltás, stb.) stimulus is kiválthatja. (261) Nefrotikus mértékű (>3,5 g/nap) proteinuriával illetve akut veseelégtelenséggel csak nagyon ritkán kezdődik a betegség (az esetek 6 illetve 3 %-ban). A laboratóriumi eltérések közül az esetek 35-50%-ban megfigyelhető szérum IgA emelkedést illetve keringő IgA tartalmú immuncomplexek jelenlétét lehet kiemelni.

Kórlefolyás: Az IgA nefropátia lefolyásáról ma már egyértelműen megállapítható, hogy a betegek többségében progressziót mutat és a kialakuló krónikus veseelégtelenség miatt, 15-25 évvel a betegség kezdetét követően, vesepótló kezelés válik szükségessé. A klinikai megfigyelések szerint a betegek egy részénél - körülbelül 2/3-ánál - a betegség lassan progrediál, míg másoknál néhány hónap, év alatt veseelégtelenség alakul ki. Gyorsabb progresszió figyelhető meg a férfiaknál, súlyosabb proteinuria (>2 g/nap),

hipertónia fennállása illetve a vesebiopsziás mintában látott kifejezettebb proliferatív elváltozások, félhold képződés és jelentős tubulointerstitialis károsodások esetén. A veseelégtelenség előrehaladtával a kardiovaszkuláris szövődmények is megnövekednek. A szívét és érrendszert károsító tényezők megismerése döntő fontosságú, mivel feltételezhető, hogy hozzájárulnak az IgA nefropátia progressziójához.

Az IgA nefropátia progressziójában jelentős szerepet játszó kardiovaszkuláris rizikófaktorok közül a mindennapi gyakorlatban a hipertónia korai felismerése és hatékony kezelése az egyik legfontosabb feladat.

Terápia: Az IgA nefropátia gyógykezelése ma sem megoldott. Specifikus terápia nem ismert. A különböző munkacsoportok ajánlásaiban a legnagyobb eltérések a kortikoszteroid és immunszuppresszív terápia indikációjában vannak. Nephrosis syndroma esetén a szteroidok adása egyértelműen elfogadott. A szteroidok a mérsékelt proteinuriát is csökkentik, de a betegség progresszióját úgy tűnik, hogy nem mérséklék, és hosszan tartó alkalmazásuk esetén a késői mellékhatások jelentkezésének nagy a valószínűsége. (262)

A nyálkahártya védekezőképességének csökkenésére utaló gyakori infekciók miatt mind a tonsillektomia, mind a korai antibiotikus kezelés ésszerű javaslat, de kontrollált tanulmányok hatékonyságukat még nem bizonyították.

A nem specifikus terápiás lehetőségek közül kiemelt jelentőségű az antihipertenzív kezelés és a fehérjeszegény diéta. A vérnyomáscsökkentés -elsősorban a glomeruláris nyomás csökkentésén keresztül - mérsékeli a proteinuriát és így részben ennek következtében a betegség progresszióját. Az ACE-gátlók (és egyes kalcium-csatorna blokkolók) emellett még jelentős antiproliferatív hatással is rendelkeznek, ezért hipertónia esetén ezek az első választandó vérnyomáscsökkentők. Normotóniás betegeknek adott kis dózisú ACE gátló is csökkentette a proteinuriát, ezzel az indikációval azonban még széles körben nem terjedt el az ACE gátlók adása. (261)

Vizsgálatok történtek még trombocita aggregációt gátlók, anticoaguláns szerek, cyclosporin A, phenytoin, nagy dózisú immunglobulin, és halolaj adásával is, de az eredmények nem meggyőzőek. (89)

5.4.1. *Endoteliális vasoaktiv anyagok; a dohányzás szerepe (tézis XVI, XVII, XVIII, publikáció 2, 9, 18, 32, 37)*

Az endotélből számos mediator szabadul fel (NO, endothelin /ET/, prosztaglandinok stb.), melyek jelentős endo-, para- és autocrin funkcióval rendelkeznek. Ismert, hogy a

veséken áramlik keresztül a keringő vér jelentős része. Krónikus glomerulonephritisekben, így IgA nefropátiában is, a vesefunkció beszűkülésével párhuzamosan egyre több betegben alakul ki magas vérnyomás. A hipertónia tovább fokozza a vesebetegségek progresszióját illetve egyes vasoactiv anyagok (pl. ET) jelentős sejtproliferatív hatással is rendelkeznek. Így, a különböző vasoactiv mediatorok az intraglomeruláris vérnyomás és sejtproliferáció befolyásolásával jelentős szerepet kaphatnak a vesebetegségek patomechanizmusában és progressziójában. A vasoactiv mediatorok közül klinikánkon az NO illetve ET vizsgálatát kezdtük meg, mert mind az NO, mind az ET - a lokális keringésszabályozás mellett - részt vesz a vesékben zajló gyulladáshoz vezető folyamatok mediálásában is (125). Amint említettük, a vizelet NOx illetve cGMP ürítéséből következtetni lehet a szervezetben termelődött NO mennyiségére. Továbbá, korábbi kísérleteinkben endotélsejt-tenyészetek vizsgálata során azt találtuk, hogy a dohányfüst gátolja a sejtek NO termelését (5.2.1. fejezet; 208). Ezért a dohányzás és a NOx ürítés kapcsolatát is vizsgáltuk az IgA nefropátiás betegekben egészségesekkel összehasonlítva.

5.4.1.1. Módszerek

Betegek: Vizsgálatunkba 59 nem dohányos, 20 dohányos IgA nefropátiás beteget illetve 20 egészséges nem dohányos és 20 egészséges dohányost vontunk be.

NOx meghatározás: Tekintettel arra, hogy a vizeletben levő NOx mérését befolyásolja a vizelet bakteriális kontaminációja, 24 órás, steril vizeletgyűjtést végeztünk. A vizeletmintákhoz E. coli által anaerob körülmények között termelt nitrát redukáz enzimet adtunk, melynek hatására a mintában lévő összes NO_3^- NO_2^- -vé redukálódott. A minták összes NO_2^- tartalmát (eredeti NO_2^- + redukált NO_3^-) Griess reagenssel határoztuk meg.

Endothelin és cGMP meghatározás: A vizelet endothelin és cGMP tartalmát radioimmunoassay-vel határoztuk meg (Amersham, UK kitékkel) klinikánk Izotóp Laboratóriumában.

5.4.1.2. Eredmények

Sem a vizelet NOx, sem a cGMP illetve endothelin ürítésben nem volt szignifikáns különbség az IgA nefropátiás betegek illetve egészséges kontrollok között (lásd 9. táblázat)

Míg egészséges kontrollokban jó korrelációt találtunk a vizelettel ürített NOx és endothelin között ($r=0,69$; $p<0,001$), hasonló összefüggést IgA nefropátiásoknál nem tudtunk megfigyelni. Sőt az ET/NO hányados IgA nefropátiásokban szignifikánsan

nagyobbnak bizonyult a kontrollokénál ($24,1 \pm 2,6$ vs. $16,4 \pm 0,8$; $p < 0,05$). Jó korrelációt találtunk a vizelettel ürített NOx és cGMP mennyisége között mind egészséges egyéneknél ($r = 0,56$; $p < 0,009$), mind IgA nefropátiásokban ($r = 0,48$; $p < 0,037$).

Az IgA nefropátiás betegek 24 órás vérnyomásparaméterei (szisztolés és diasztolés átlag) és a vizelettel ürített NOx között negatív szignifikáns ($p < 0,001$) korrelációt találtunk, míg az endothelin és a hasonló vérnyomásparaméterek között ilyen összefüggés nem volt megfigyelhető.

Az életkorral csökkenőnek találtuk IgA nefropátiás betegekben a NOx kiválasztását ($r = -0,49$; $p < 0,01$), míg az endothelinnel illetve cGMP-vel kapcsolatban ilyen megfigyelésünk nem volt. (Ez utóbbiban azonban szerepet játszhat a kisebb esetszám is.) A creatinin-clearance és a vazoaktív mediátorok ürítése között nem volt szignifikáns kapcsolat.

Szignifikánsan megnövekedett ($p < 0,05$) NOx kiválasztást észleltünk mind az egészséges ($1,458 \pm 0,104$ vs. $1,112 \pm 0,060$ mmol/die), mind az IgA nefropátiás dohányosoknál ($1,339 \pm 0,087$ vs. $0,986 \pm 0,054$ mmol/die) a nem dohányos IgA nefropátiásokkal és egészséges kontrollokkal összehasonlítva. A dohányos beteg és kontroll csoportokban nem volt összefüggés a vizelet NOx és cGMP ürítés között.

Szerves nitrát terápiaiban részesülő IgA nefropátiás betegeinkben a kor és vérnyomásátlag alapján választott nitrátot nem szedő IgA nefropátiás kontroll csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett vizelet NOx kiválasztást észleltünk ($n = 12$; $0,739 \pm 0,056$ vs. $0,942 \pm 0,017$ mmol/die; $p < 0,05$).

5.4.1.3. Összefoglalás

IgA nefropátiás betegekben az ET/NO arány magasabbnak mutatkozott, mint egészségesekben. Ezen betegek magasabb vérnyomásátlagai vagy idősebb életkora csökkent vizelettel történő NOx kiválasztással járt együtt.

Nem dohányos és nitrátot nem szedő betegekben, illetve kontrolloknál a vizelettel ürített NOx és cGMP között egyenes arányosságot találtunk, míg dohányosokban, vagy nitrátot szedőkben a vizeletben magasabb NOx értékeket mértünk.

5.4.2. Ambuláns vérnyomásmonitorozás (tézis XIX, *publikáció 1, 18, 19, 21*)

A krónikus renoparenchymas betegségekben, így pl. az IgA nefropátiában megjelenő magas vérnyomás kialakulásában számos tényező szerepet játszhat, de a pontos

patomechanizmus még ma sem tisztázott. A hipertónia kedvezőtlen, progressziót fokozó hatása jól ismert krónikus glomerulonephritisekben, így IgA nefropátiában is. Ezért a betegek életkilátásának és túlélésének javításában a magas vérnyomás korai felismerésének és az antihypertensiv terápia hatékonyságának nagyon nagy szerepe van.

A 24 órás vérnyomásmonitorozás (ABPM) teljesebb képet ad a napi vérnyomás változásról (88) mint az eseti mérések, illetve eredményei a célszervkárosodásokkal is szorosabb kapcsolatot mutatnak az eseti méréseknél. A vérnyomásmonitorozás alapján új jelenségeket írtak le, mint például a fehérvérnyomás hipertónia (melyről akkor beszélünk, ha a rendelőben/kórházi körülmények között mért 3 vérnyomás átlaga meghaladja a 140/90 Hgmm-t, míg ABPM-el mért átlag vérnyomás <135/85 Hgmm) vagy a dipper jelenség (fiziológias körülmények között az éjszakai vérnyomás átlaga legalább 10 %-al alacsonyabb a nappali vérnyomás átlagánál, amennyiben ez megfigyelhető, akkor beszélünk dipper jelenségről). Betegek nagyszámú ABPM vizsgálatával az IgA nefropátiások vérnyomásának jellegzetességeiről gyűjtöttünk adatokat.

5.4.2.1. Módszerek

Betegek: Első vizsgálatunkba 50 (21 normotenzív, 29 hipertóniás), a másodikba 126 (55 normotenzív, 71 hipertóniás) gondozott IgA nefropátiás beteget vontunk be.

A 24 órás vérnyomás monitorozást oszcillometriás elven működő Meditech ABPM-02 és -03 típusú vérnyomásmonitorokkal végeztük, a monitor programozása és a mérési adatok leolvasása IBM PC kompatibilis számítógéppel, a Meditech szoftver (ABPMBASE) segítségével történt.

5.4.2.2. Eredmények

IgA nephropathiás betegekben (n=50) a kauzálisan mért vérnyomásértékek átlaga ($135,7 \pm 14,0/87,8 \pm 8,8$ Hgmm) szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,005$) az ABPM-mel mért 24 órás ($126,3 \pm 10,2/82,3 \pm 8,8$ Hgmm), nappali ($127,2 \pm 10,2/83,3 \pm 9,5$ Hgmm) és éjszakai vérnyomásátlagoknál ($123,6 \pm 14,8/79,1 \pm 11,5$ Hgmm).

A normotenzív betegek (n=55) 82%-nál megtartott diurnális vérnyomásingadozást találtunk (dipperek), míg a hipertóniás IgA nefropátiások (n=71) 93 %-a non-dipper volt.

A vérnyomásmonitorozás illetve eseti vérnyommérések összevetése alapján a normotóniás betegek (n=55) 18 %-nál (10 fő), a kezelt hipertóniások 20 %-nál (14 fő) figyeltünk meg fehérvérnyomás jelenséget.

A kezelt hipertóniás IgA nefropátiás betegek 24 órás ($128,3 \pm 9,9 / 84,7 \pm 9,4$ vs. $119,2 \pm 8,6 / 75,8 \pm 6,3$ Hgmm) és éjszakai vérnyomásátalaga ($125,2 \pm 8,9 / 81,4 \pm 7,1$ vs. $107,9 \pm 8,9 / 67,3 \pm 5,8$ Hgmm) szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) volt, mint a normotenziósoké. Ugyanezt a jelenséget a nappali vérnyomásátalagok esetében ($128,0 \pm 9,7 / 84,6 \pm 8,9$ vs. $124,7 \pm 8,0 / 81,4 \pm 4,7$ Hgmm) nem észleltük.

Átlag 36 hónapos követés alatt szignifikánsan emelkedett a szérum-kreatinin érték a hipertóniás ($n=52$; 101 ± 28 vs. 124 ± 32 μM), a non-dipper normotóniás ($n=8$; 89 ± 18 vs. 106 ± 17 μM), és a fehérköpeny hipertóniás ($n=10$; 88 ± 19 vs. 105 ± 19 μM) betegekben, míg a normotensív ($n=43$; 89 ± 17 vs. 93 ± 22 μM) illetve dipper normotensív ($n=28$; 81 ± 14 vs. 84 ± 18 μM) betegekben ez nem volt megfigyelhető.

5.4.2.3. Összefoglalás

Az ABPM vizsgálat alapján a fehér-köpeny hipertónia előfordulási gyakorisága az IgA nephropátiás betegekben hasonló az átlag populációhoz. A hipertóniások, a non-dipperek illetve fehérköpeny hipertóniát mutató normotóniás IgA nephropátiás betegek vesefunkciójának romlása gyorsabb.

5.4.3. Terápia (tézis XX, publikáció 23, 24, 33)

A fenti fejezetekben (5.4.1. és 5.4.2.) saját adatainkkal is alátámasztottuk a hipertónia kedvezőtlen hatását az IgA nefropátia progressziójára illetve kardialis szövődményekre, melyet más munkacsoportok is megerősítettek (261). Ezért kiemelten fontosnak tűnik a magas vérnyomás mind hatékonyabb kezelése. Az irodalomból ismert, hogy az ACE inhibitorok és egyes CCB-k renoprotektív hatása kifejezettebb, mint a más hatástani csoportba tartozó, de a szisztémás vérnyomást ugyanolyan hatékonyan csökkentő antihypertensivumoké. (100) Az azonos hatáscsoportba tartozó, de eltérő farmakokinetikájú gyógyszerek összehasonlítására csak rövidtávú vizsgálatok ismertek. Ezért kezdtük vizsgálni a különböző hatástartamú antihypertensivumok renoprotektív hatásaiban fennálló esetleges különbségeket.

5.4.3.1. Módszerek

Betegek: Első vizsgálatunkban 32 hipertóniás ABPM vizsgálaton átesett IgA nefropátiás beteg adatait elemeztük. A másodikba 22 olyan IgA nefropátiás beteget vontunk be, akiknél legalább 3 évi rövid hatású antihypertensivum szedését követően váltottunk

hosszúhatású ACE gátlóra és/vagy CCB-re.

1/creatinin egyenesek elemzése: A szérum kreatinin reciprok értékeiből meghatározott egyenesek meredeksége érzékenyebben jelzi a vesebetegség krónikus progresszióját, mint a kreatinin értékek önmagában. (199) Ezért a progresszió megítélésére az ABPM vizsgálat előtt illetve azt követően, rövidhatású és hosszúhatású antihipertenzív terápia 3-3 éve alatt mért szérum kreatinin értékekből az idő függvényében az 1/creatininek által meghatározott egyenesek meredekségét hasonlítottuk össze.

5.4.3.2. Eredmények

Hipertóniás IgA nefropátiás betegekben (n=32) ABPM vizsgálat alapján végzett terápia módosításával szignifikáns progresszió-lassulás volt elérhető az 1/creatinin egyenesek alapján (iránytangens: $-3,653 \times 10^{-5}$ vs. $5,602 \times 10^{-5}$; $p < 0,03$).

Az IgA nefropátiás (n=22) betegekben a hosszúhatású ACE gátló és/vagy CCB terápia alatt szignifikánsan alacsonyabb volt a 24 órás diasztolés vérnyomás átlag ($84,15 \pm 7,94$ vs. $79,78 \pm 7,17$ Hgmm, $p < 0,05$), a diasztolés hipertóniás időindex ($43,58 \pm 23,57$ vs. $25,61 \pm 20,1\%$, $p < 0,05$), a diasztolés hyperbariás impakt érték ($114,71 \pm 81,9$ vs. $51,51 \pm 51,4$ Hgmm x h, $p < 0,05$), mint rövidebb hatású ACE gátlók és/vagy CCB-k szedése mellett.

A 18 proteinuriás betegnél a hosszúhatású készítményekre történt átállítás után három évvel szignifikánsan alacsonyabb volt a proteinuria mértéke mint korábban ($1,18 \pm 0,94$ vs. $0,69 \pm 1,08$ g/nap, $p < 0,05$).

A rövidhatású ACE gátlók, illetve CCB-k szedése alatt számított creatinin-clearance azonos szinten volt a hosszúhatású készítményekre történt átállítás után három évvel is ($69,87 \pm 20,44$ vs. $74,35 \pm 26,86$ ml/min, NS).

Az idő függvényében ábrázolt 1/creatinin egyenesek iránytangensének a meredeksége szignifikánsan csökkent a hosszúhatású ACE gátlók és/vagy CCB-szedése után három évvel ($-5,28 \times 10^{-5}$ vs. $1,03 \times 10^{-4}$; $p < 0,05$).

5.4.3.3. Összefoglalás

Hipertónia esetén az IgA nefropátia progressziója a 24 órás vérnyomásmonitorozás eredményeire alapozott gyógykezeléssel illetve hosszabb hatástartamú ACE-gátló illetve Ca-csatorna blokkoló adásával jobban mérsékelhető.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Endotélsejtek intakt L-arg - nitrogén monoxid rendszere in vitro

A patkány mezentériumából izolált arteriolák és venulák endotélsejtjei L-arg – NO rendszerét összehasonlító vizsgálatunk fő eredménye szerint az eNOS enzim mennyisége, a NOS aktivitás és az intracelluláris L-arg koncentráció nagyobb a posztkapilláris endotélsejtekben. Ez arra utalhat, hogy a venuláris endotélium nagyobb öröklött NO szintetizáló képességgel rendelkezik, mint az arterioláris. Ez összhangban áll Bohlen eredményeivel (49), aki kimutatta, hogy bár nem volt szignifikáns különbség az arterioláris és venuláris NO koncentrációk átlagában (az abszolút értékek nagyfokú varianciája miatt), mégis, az NO koncentráció a mezenterikus venulák 80%-ában in vivo magasabb volt az arteriolákhoz képest. Más tanulmányok azt bizonyítják, hogy a vénás endotélium NO termelő képessége nem jobb, sőt bizonyos esetekben még gyengébb is az artériásénál. Például BAEC és vena cava tenyésztett endotélsejtjei bradikinin adása után ugyanolyan mennyiségben termelnek NO-t (221). A nyíróerő és az acetilkolin kevesebb NO-t stimulál a juguláris vénából, mint a karotiszból (97); és a nyíróerőnek kisebb szerepe van az NO-függő koronária-dilatációban venulákban, mint arteriolákban (160, 161).

Mindezek egybevetve alátámasztják azt az egyre jobban elfogadott nézetet, hogy jelentős regionális, szegmentális különbségek lehetnek a vaszkuláris endotélium NO termelő funkciójában és/vagy az NO hatásaiban a különböző ereken (41). Emiatt nem szabad általánosítani egyes erek vagy értípusok megfigyelése alapján.

A posztkapillárisan termelődő NO-nak fontos élettani szerepe van. A venulák folyamatos NO szintézise hozzájárul az alacsony venuláris vaszkuláris rezisztenciához, ami szükséges a kapillárisok megvédéséhez a nagy hidrosztatikai nyomástól (40, 49, 220), illetve a posztkapilláris NO szerepet játszik a venulafal áteresztőképességének szabályozásában is (16). Továbbá, a megemelkedett venuláris NO képes átdiffundálni a közeli arteriolákhoz is (40, 49, 87). Valószínű azonban, hogy a venulárisan termelődő NO elsődleges szerepe a fehérvérsejtek aggregációjának és adhéziójának gátlása. Az alacsony nyíróerő könnyebben lehetővé teszi a fehérvérsejtek kitapadását, amit az NO megakadályoz, a következményesen kialakuló gyulladással együtt (107, 158). A NOS gátlása nem befolyásolja a kísérletesen okozott trombólízist arteriolákban, de jelentősen fokozza azt venulákban és exogén L-arg, illetve NO-donorok megelőzték az akut NOS-gátlás protrombotikus hatását venulákban (53). Az NO e szelektív hatása különösen jelentős, mivel a citokin-stimulált monocita adhézió elsődlegesen a venuláris endotéliumon jön létre (136).

Kísérleteinkben nagyobb mennyiségű eNOS-t találtunk a venuláris endotélsejtekben

in vitro (8. ábra), illetve *in vivo* is (13. ábra). Más hisztokémiai tanulmányok kevesebb eNOS-t mutattak ki a vénás endotéliumban, mint a koronáriák artériáiban (9) és mind patkány, mind ember szubmukózájában (215). Ezek a különbségek az alkalmazott hisztokémiai módszerek nem-kvantitatív természetére, faji és/vagy a fent említett regionális különbségekre, illetve a sejtenyészet és az *in vivo* állapot különbségére is utalhatnak.

A venuláris endotéliumban általunk megfigyelt nagyobb NOS aktivitás (10. ábra) összhangban van a nagyobb eNOS protein mennyiséggel. Magasabb L-arg koncentrációt is találtunk a venuláris endotéliumban (11. ábra), ami meglepő, hiszen a magasabb NOS aktivitás miatt nagyobb L-arg fogyasztást is várnánk. Azonban azt is megfigyeltük, hogy akut NOS-gátlás L-NMA-val megemeli az intracelluláris L-arg koncentrációt mind az arterioláris, mind a venuláris endotélsejtekben. Feltételeztük, hogy ennek hátterében nagyobb mértékű L-arg transzport áll, de adataink nem ezt igazolták (12. ábra). Endotélsejtek tenyészetben képesek az L-arg szintézisére (116), és az is lehetséges, hogy a venuláris endotélsejtek nagyobb mértékben képesek erre a mezentériumban.

Az endotél funkció artério-venózus különbségeiért biztosan több faktor is felelős. Ezt a heterogén viselkedést részben a különböző endotélsejt-populációk között jelen lévő intrinszik molekuláris és biokémiai különbségek határozzák meg (121, 274). Habár endotélsejtek tenyészetben elveszthetik bizonyos tulajdonságaikat (101, 254), más jellemzők megmaradhatnak (32, 103). Megfigyeléseink alapján világos különbségek láthatók az arterioláris és venuláris endotélsejt-tenyészetek L-arg-NO rendszerében, melyeket kétség kívül számos faktor befolyásol *in vivo*: 1.) direkt interakció a szomszédos sejtekkel (101), 2.) autokrin, parakrin és keringő faktorok (182), 3.) hemodinamikai erők, mint a nyomás és a nyíróerő (40, 48). Mégis, az általunk vizsgálttal megegyező erek falából történő direkt NO-mérés azt sugallja, hogy a venuláris endotélium *in vivo* is képes a magasabb NO termelésre az arteriolákhoz viszonyítva (49). A venulák nagyobb bazális NO produkciója lehet kompenzatórikus adaptáció, mely az alacsony nyíróerejű környezetben a tromboembóliák kialakulásának megelőzését szolgálja.

6.2. A dohányfüst hatása az NO-cGMP útvonalra: cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben

Kísérletes gyomorfekély modellben a dohányfüst csökkentette a vérátáramlást és a konstitutív NOS aktivitását (184). Az általunk használt dohányfüst-modell révén nyert eredmények arra utalnak, hogy a dohányfüst az endotélsejt cGMP termelését a kritikus tiol csoportok oxidációja révén gátolja, melyet friss irodalmi adat is igazol (252). A dohányfüst az NO-GC-cGMP jelátvitel több pontján képes hatni, mivel a működéshez szükséges tiol

csoporthoz a rendszer több lépésében is megtalálhatók. Sőt már az NO termelődése előtti szakasz, az NO produkciót indukáló, agonista-kiváltotta kalcium beáramlás károsodhat az endotélsejtekben az oxidatív stressz hatására (83). A dohányfüstben tiol csoportot károsító tényezőt mutattak ki (235), amely például az SH-enzim glükóz-6-foszfát dehidrogenázt (165), az acetaldehid dehidrogenázt (170) és a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt is (86) gátolni képes. A glükóz-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 reduktáznak, 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 (301) a Na^+/K^+ ATPase aktivitásának csökkenését okozza, ami azután az intracelluláris ion homeostasis megbomlásához, a nátrium ion koncentráció növekedéséhez vezet. Ugyanez a folyamat a simaizomsejtekben is lejátszódhat, ahol az intracelluláris nátrium ion koncentráció növekedése aktiválhatja a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseretranszportot, ami növeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, kontrakcióhoz és vazokonstriktióhoz vezetve (206). Ez is oka lehet a dohányzás vérnyomást emelő hatásának. A tiol csoport a guanilát cikláz enzim aktivitásához is szükséges (127). A fehérjék szabad tiol csoportjainak oxidálása révén fehérje-fehérje interakció jöhet létre, és ezáltal nagymolekulású polimerek is keletkezhetnek. Mésrészt viszont, a szabad gyökök reakcióiban fehérje fragmentáció is kialakulhat.

A dohányfüstben számos oxidáló tulajdonságú anyag is kimutatható, köztük H_2O_2 (66). Feltételezhető, hogy a H_2O_2 az endotélsejtek károsodásának egyik mediátora (19). 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 valószínűsítjük, hogy modellünkben sem a szuperoxid anion -, 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 ágens képes elfogni. Így például gátolja a dohányfüstben nagy koncentrációban jelenlevő nitrogén oxidok (NO, peroxinitrit: ONOO^- , nitrogén dioxid szabad gyök: $\cdot\text{NO}_2$, nitrit anion: NO_2^-) hatását is. Meglepő, hogy a dohányfüst nagy NO koncentrációja ellenére az

endotélsejtekben 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. Ezidő 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 (155). Így a tüdőben történő expozíció hatását a vörösvértestek transzportálják a tüdőtől távoli szervekbe is. Természetesen ezek a szabad gyökös folyamatok elsősorban a vörösvértestekkel közvetlen kapcsolatba kerülő endotélsejteket érintik. Az oxidatív stressz miatt a hem kiszabadulhat a vörösvértestekből és a szabad gyökök direkt (17) vagy indirekt módon (az LDL oxidálása következtében) károsíthatják az endotélsejteket (18).

A cigarettafüstben nagy mennyiségű formaldehidet tudunk kimutatni. A formaldehid alapvetően két mechanizmus segítségével képes károsítani a fehérjéket. Egyrészt keresztkötéseket létesít a fehérjék aminocsoportjai között, másrészt a tiol csoporttal reagál. A GSH elfogyását vizsgálva a GSH fogyási görbe korrelációs koefficiensét $r=-0,99$ -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-endotélium és inzulin-trombocita rendszer) a cGMP termelésért az NO-aktiválta szolubilis 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 (149). A D-, E-, és F-típusú guanilát cikláz működése még kevésbé ismert.

6.3. A dohányzás hatása az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételére

Az aktív eNOS izozim dimer alakban fordul elő (279, 324). SDS-PAGE módszer során bekövetkező denaturációval a monomer molekulásúlya 135 kD (231). Mosott trombociták és endotélsejtek 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 (18. ábra).

Endotélsejtek esetében a 270 kD molekulású fehérje eltűnésének a dohányfüst expozíció idejétől való függését mutattuk be (19. 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 találtakkal megegyezett e kísérletünk abban is, hogy egyéb scavangerek hatástalanok voltak. Az eNOS károsodásának bizonyítására Western blot analízis elvégzését tervezzük.

6. 4. A trombociták szabad gyök termelése hiperinzulinémiában

(Az inzulin hatása a trombocita eNOS izoenzimre)

Az NO meghatározása biológiai rendszerekben sokszor nehézségbe 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, amelynek során az NO-t peroxinitritté alakították, és ezt mérték luminol kemilumineszcenciával (146). Az új módszerrel a leukocyták peroxinitrit termelését is mérni lehetett (61). Az általunk, a trombociták peroxinitrit termelésének kimutatására kidolgozott eljárás szenzitív és szelektív módszernek bizonyult. Szenzitív, mert a fiziológiás, éhgyomri plazma inzulin szintet megközelítő 84 pM-es koncentráció hatását már kimutatja. 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 anion és NO termelést a trombocitákban? Van-e hatása annak az NO-nak, amely szuperoxid anion szabad gyökkel együtt keletkezik?

Újabban került felismerésre, hogy a NOS enzim elektron transzportja bizonyos körülmények között "szétkapcsolódik" (234). 100 μ M-es arginin koncentráció alatt a NOS növekvő mértékben termel szuperoxid anion szabad gyököt (316), ami 10 μ M-es arginin koncentráció esetén meghaladja az NO keletkezés mértékét (117). 10-100 μ M között az enzim NO-t és szuperoxid anion szabad gyököt is termel, ami peroxinitrit képződéshez vezet (315). Az intracelluláris arginin koncentrációs-viszonyokról kevés információnk van, de becslések szerint egyes sejten belüli kompartmentekben akár több száz mikromólos

koncentrációk is kialakulhatnak (13, 116). A NOS K_m érték az argininre nézve hozzávetőlegesen $5 \mu\text{M}$ (296), ezért nehéz elképzelni, hogy NOS enzim szubsztrát hiány előfordulhat. Ugyanakkor arginin nagy dóziséval megszüntethető volt a NOS szétkapcsolt állapota (65). 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 (64, 195, 239, 240) mind NO mind szuperoxid anion szabad gyök termelésére képes, és ez utóbbit elsősorban az extracelluláris térbe szekretálja. Ha ez egyidejűleg történik, akkor extracelluláris peroxinitrit képződhet. Továbbra sem megoldott az a kérdés, hogy hogyan fokozza az inzulin egyszerre mindkét gyök termelését? Ha a peroxinitrit nem aktiválja a szolubilis guanilát cikláz, akkor hogy lehet az, hogy az inzulin mégis NO dependens módon emeli a trombocitákban a cGMP-t (289)? Egy lehetséges magyarázatként szolgálhat az a megfigyelés, hogy a trombociták által termelt NO nem lép ki a vérlemezkékből (202). Kísérleteink alapján talán helyesebb azt mondani, hogy a trombociták által termelt, intracellulárisan ható NO csak szuperoxid anionnal 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 luminol-chemilumineszcencia-növekedést, nem volt szükség inkubációs időre, ami alatt a trombociták 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 trombociták endotelialis NOS enzimet tartalmaznak (64, 132, 239, 240). Az endotelialis NOS enzim ugyanis az endotélium- és szívizom sejtekben a membrán egy speciális részéhez, az ún. caveolához kötődik, ami a plazma membrán invaginációs helye (90, 270). A membránban működő eNOS enzim termelt NO-t mind a sejtbe, mind pedig az extracelluláris térbe képes transportálni. A szuperoxid anion szabad gyök szekréciója, úgy tűnik, hogy a trombocitákban 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 anion szabad gyök koncentrációja: vagy az eNOS hatására, a plazmamembrán szoros közelségében termelődött szuperoxid anion átjut a membránon az anion csatornákon keresztül (72), vagy az eNOS képes szuperoxid aniont direkt módon az extracelluláris térbe juttatni, vagy pedig a plazmamembránon keresztül történő elektrontranszport aktivációja következik be inzulin hatására, ami szuperoxid anion termelődéshez vezet az extracelluláris térben (80, 281).

Az endotélsejt, agonista hatásra, NO-t szekretál az extracelluláris térbe, ami trombocita aggregáció gátlást, a simaizomzat relaxációját, és végeredményben vazodilatációt okoz. Az eNOS enzim caveola membránhoz való kötődését zsírsavval, nevezetesen palmitáttal történő acilációja biztosítja (231, 257), ezért csak detergens jelenlétében mobilizálható. Kísérleteink alapján felmerül annak lehetősége is, hogy trombocitákban 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 trombociták 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 (198). Az endotélsejteken az agonisták receptorai (muszkarin m2, bradikinin B2 receptor) a caveolán, vagy a caveolához közeli membrán felszíneken helyezkednek el, biztosítva ily módon a postreceptorális hatás kifejlődését intracellulárisan (71, 91, 302). A caveola felszínén található az inzulin receptora is, mely szerepet játszik az inzulin transzendenteliális transzportjában is (266). Tartós agonista hatás esetén az eNOS depalmitálódik, és ezzel kiszakad aktív helyéről, a caveolából, megszakítva az NO termelést. Kísérleteinkben láttuk, hogy az inzulin indukálta NO produkció 2-3 perc alatt lezajlott. Annak ellenére, hogy a kísérleteinkben tapasztaltakkal szorosan egybevágnak az irodalom eNOS-ról leírt adatai, meg kell jegyeznünk, hogy ezidáig a trombocitákban nem vizsgálták a caveola jelenlétét.

6.5. Az L-arg nem enzimátikus glikációja

A nem-enzimátikus glikáció

Az öregedés során és diabetes mellitusban hasonló pathomechanizmus figyelhető meg; a nem-enzimátikus glikáció és az oxidatív stressz. Ezek a folyamatok cukorbetegségben felgyorsulnak, azaz a diabetes mellitus felgyorsult öregedést jelenthet (323). 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 (30, 288). A szabad gyökök által károsított szövetekből nyert fehérjék 360 nm-es excitáció mellett 454 nm-nél mutatnak emissziós maximumot, ugyanúgy mint a diabeteses szövetek (excitáció: 350-370 nm, emisszió: 440-460 nm) (134). Ezen adatok megismerése óta egyre többen beszélnek az ún. karbonil

stresszről (173, 183). A karbonil stressz a fehérjék, aminosavak és/vagy foszfolipidek nem enzimatis glikációjának és az oxidatív stressznek a közös „végkifejlete”. Az oxidatív stressz során termelt leglényegesebb karbonilok a malondialdehid és a 4-hidroxinonenal (85). Érdekes megfigyelés, hogy az aldóz reduktáz enzim, mely diabetes mellitusban indukálódik és katalizálja a sorbitol anyagcsereút első lépését, a 4-hidroxinonenalt nem toxikus alkohollá képes átalakítani (275). A malondialdehid, amit a lipidperoxidáció kizárólagos markerének hittek sokáig, aminosav (L-arg, L-glu, L-pro stb.) és dezoxiribóz oxidatív károsodása révén is termelődhet (111).

A nem-enzimatis glikáció során keletkező leglényegesebb karbonilok a glukoazon, a dezoxiglukoazon (15), a glioxál-metilglioxál (105, 305, 328), a formaldehid és az acetaldehid (255). Az oxidatív stressz és a nem-enzimatis glikáció során termelt karbonilok egyaránt Schiff bázist képeznek a fehérjék, aminosavak és a foszfolipidek aminocsoportjával. Ez a lépés még reverzibilis, de intramolekuláris elektron átrendeződés révén irreverzibilissé válhat, az így keletkező vegyületeket Amadori termékeknek hívjuk. Az Amadori termékek intramolekuláris átrendeződése szabad gyökös degradációja, más aminosav amino- vagy az L-arg guanidino csoportjához való kapcsolódása glikációs végtermékek (advanced glycation end-product, AGE) képződéséhez, vagy átmeneti fém jelenlétében a szuperoxid anion szabad gyök és glükóz esetében glükoozon termelődéséhez vezethet (115). Az AGE termékek egy része fluoreszkál, mint pl. a pentozidin (Ex:335 nm, Em:395 nm; 207), a crossline (370/440 nm; 126, 209), és a vesperlysine A (WI370/440 nm; 210). Egyéb termékek nem fluoreszkálnak, mint pl. a karboxi-metil-lizin (3, 82), a glioxál-lizin dimer (GOLD; 303) és a metil-glioxál-lizin dimer (MOLD; 304). Ma már valószínű, hogy több tucat (száz?) AGE termék létezik.

Az AGE termékek jelentősége az, hogy az elmondottak szerint oxidatív stresszt indukálnak maguk is, amellet, hogy szabad gyökös folyamatok termékei lehetnek. Ezzel együtt a fehérjék, foszfolipidek szerkezetét megváltoztatják, és funkciójukat rontják. Különösen érzékenyek ezekre a behatásokra azok a proteinek, amelyekhez lipidek is kapcsolódnak, mint pl. az LDL és az albumin (173). A szérum (fruktózin) és a vörösvértest fehérjéinek (haemoglobin A1c) glikációját felhasználjuk a betegek glycaemiás állapotának mérésére (267). Újabb szempont szerint a malondialdehid növeli a haemoglobin glikációját (131), vagy felmerül annak lehetősége is, hogy a használt módszerek nem szelektívek a glikációra és az oxidatív stresszből eredő protein-karbonil termékeket is kimutatják. Ez esetben hamisan magas haemoglobin A_{1c} értéket detektálhatunk. A glikált fehérjék immunogén tulajdonságúak lehetnek és így keringő

immunkomplexet képezhetnek. Ez utóbbi elősegíti a makrofágokon keresztüli eliminációjukat a keringésből (310), bár ismertek specifikus AGE receptorok is (RAGE), amelyek révén a különböző sejtek (endotélium, vese tubulus epithel, podocyta, makrofág, mesangium stb) az AGE-t fagocitálni képesek (297). A makrofágok fagocitózis után degradálják az AGE proteineket, különösen azokat, amelyek L-arg csoportját metil-glioxál módosítja (306), majd az így keletkező ún. alacsony-molekulasúlyú AGE termékeket a keringésbe juttatják. A keringő alacsony-molekulasúlyú AGE termékeket a vese a vizelettel kiválasztja (55). Azokban a sejtekben, amelyekben az AGE felvételre kerül, aktiválódik egy citoszolikus transzkripciós faktor, a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B), és többek között növekedési faktorok, és extracelluláris mátrix proteinek termelődnek (34, 236). Nagyrészt ezek a folyamatok tehetők felelőssé a diabeteses komplikációkért (ateroszklerózis, nefropátia) és az uraemiás betegek ateroszklerózisáért (63).

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 semmiben nem különböznek az endogén, in vivo képződöttektől (156). Tehát az AGE metabolizmus harmadik vonatkozása az AGE bevitele a táplálékkal. Saját L-arg-nel és glükózzal kapcsolatos kísérleteink is elsősorban ehhez kapcsolódnak. Minden bizonnyal in vivo is lejátszódik a 26. ábrán bemutatott L-arg 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 L-arg glikációját a vas katalizálja, amely katalízist a ferri-ferro redukciót gátló dezferrioxamin megakadályozza, feltételezhetjük, hogy a folyamat melléktermékeként szuperoxid anion szabad gyök is termelődik, hiszen a ferro vas képes az oxigént redukálni. Az így termelt szuperoxid anion szabad gyök hatástalaníthatja az inzulin-NO szignált. Az AGE-termékek NO-hatást gátló effektusa jól ismert (123).

Továbbá, kísérleteink alapján (a disszertáció terjedelmének szem előtt tartása miatt részletesen nem taglalt eredményeink szerint) az L-arg jelenlétében az oldatokban nyomokban jelen levő vas elég volt ahhoz, hogy hidroxil szabad gyök keletkezzen már szobahőmérsékleten is (szuperoxid anion szabad gyök termelődése révén, ami spontán dizmutálódhat hidrogén peroxiddá, ami a Fenton reakcióban hidroxil szabad gyököt hoz létre). A hidroxil szabad gyök hatására viszont glukóz jelenlétében glukóz szabad gyök

képződhet, amely reaktív tulajdonsága miatt fokozottan képes a glikációs folyamatok megindítására.(12, 36)

6.6. Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatása endotélsejtekre

KVB-ben szenvedők plazmájának hatása az eNOS aktivitása változó, és nagyfokban meghatározza a plazma ADMA koncentráció. A betegek kb. feléből származó plazma gátolta az eNOS aktivitást HDMVEC-ben, azonban nem volt nyilvánvaló összefüggés a NOS aktivitásra kifejtett hatás és a primér vesebetegség között. Például, 2 diabeteses nephropátiában szenvedő beteg plazmája gátló hatású volt, míg másik 2 betegé nem befolyásolta az eNOS aktivitást (4. táblázat). Több betegnek volt immun-mediált betegsége (pl. krónikus interstitialis nephritis, IgA nefropátia), és immun-mediált betegségek akut fázisában megemelkedett intrarenális NO termelést (iNOS) írtak le (132), bár a teljes NO termelés csökkent lehet patkányokban krónikus, posztglomerulonephritises vesebetegségben (298). Mindemellett elképzelhetőnek tartottuk, hogy iNOS aktiváló faktorok bizonyos betegekben elfedhetik az eNOS aktivitás csökkenését. Azonban dexametazonnal történt előkezelés – ami az iNOS transzkripciót gátolja (202) – nem változtatta meg a HDMVEC sejtek NOS aktivitását 6 óráig tartó, 20%-os plazmával történt inkubációnál. Továbbá, Western blottal sem sikerült kimutatni az iNOS proteint az inkubáció után, így biztosak lehettünk abban, hogy eNOS aktivitást mértünk.

Minden beteg antihipertenzív kezelésben részesült (egy vagy több szerrel), amikor a vérvétel történt, így felmerült, hogy a gyógyszerelés befolyásolhatja és megmagyarázhatja a NOS aktivitás eredményekben tapasztalt nagy variabilitást, de nem volt összefüggés a NOS aktivitás és egyik gyógyszer között sem. A gyógyszerek között diuretikumok (furosemid és hidroklorotiazid), kalcium-csatorna blokkolók (amlodipin és diltiazem), β -receptor blokkoló (metoprolol) és ACE-gátlók (enalapril, captopril és lisinopril) voltak. Korábbi tanulmányok leírták, hogy ezek a szerek vagy nem befolyásolják az NO termelést (β -receptor blokkolók: 256, verapamil: 78), vagy növelhetik azt (diuretikumok, bizonyos kalcium csatorna blokkolók /nifedipin és diltiazem/ és ACE-gátlók) az erek endotéliumában (78, 308, 326). Így, a néhány beteg plazmája kapcsán észlelt eNOS aktivitás-gátlás oka nem az antihipertenzív terápiában rejlik.

Annak kiderítésére, hogy mégis mi okozza az esetek egy részében mért NOS aktivitás csökkenést, megmértük az L-arg analóg ADMA és SDMA koncentrációját a plazmában. Az ADMA kompetitíve képes a NOS enzimhez kapcsolódni és képes gátolni azt (293). Bár a teljes betegcsoport ADMA átlaga számszerint nagyobb volt a kontrollokénál,

mégsem volt a különbség szignifikáns. Mégis, a betegek plazmája NOS aktivitást befolyásoló hatása alapján történt alcsoportokra való osztása után szignifikáns különbséget találtunk. Azon betegek plazmája, akiké gátolta a NOS aktivitást, magasabb ADMA koncentrációt mutatott, míg azoké, akiknek a plazmája a kontrollokéval azonos NOS aktivitást mutatott, az ADMA szintjük is alacsonyabb volt. Fontos azonban megjegyezni, hogy a plazmát ötszörösére hígítottuk a 6 órás inkubáció alatt, így az inkubáló oldat ADMA koncentrációja csak $\sim 0,5 \mu\text{M}$ volt. Kimutattuk, hogy ez a koncentráció *in vitro* nem befolyásolja az eNOS aktivitást; *in vivo* azonban valószínű, hogy a megemelkedett plazma ADMA szint részt vesz az eNOS gátlásban, és markere is lehet más, az eNOS-t gátló anyagoknak bizonyos KVB-ben szenvedő betegekben.

Miért csak bizonyos betegekben magasabb a plazma ADMA szint? Többet azt feltételezték, hogy ez a csökkent vese klírenszt következménye (264, 265, 293). Ebben a vizsgálatban azonban nem találtunk összefüggést a maradék vese funkció és a plazma ADMA szintek között. Mind az urea, mind a kreatinin szintek egyformán magasak voltak az összes KVB-ben szenvedő betegben az ADMA szintekben mutatkozó jelentős különbségek ellenére. Nemrég egy tanulmány megemelkedett plazma ADMA-ról számolt be hiperkoleszterolémias patkányokban, a vese funkció csökkenése nélkül (39). Ez azt sugallja, hogy a metilált argininek szintézisében és/vagy katabolizmusában bekövetkező változások is hozzájárulhatnak a funkcionális NOS gátláshoz bizonyos esetekben, így talán KVB-ben is. A metilargininek lebontását végzi a DDAH enzim. A DDAH sokféle szövetben előfordul, és nagy koncentrációban található meg a patkány veséjében és aortájában is (147). A DDAH és a NOS együttes előfordulását is leírták a vesében (286) és a DDAH gátlása (ami az ADMA akkumulációjával jár), gátolja az endotélium-függő érelernyedést (186). A DDAH bontja az ADMA-t, de nem az inaktív SDMA-t (219), így a megváltozott DDAH aktivitás befolyásolhatja az ADMA szintjét, mint azokban a KVB-ben szenvedő betegekben, akiknek a plazmája gátolta a NOS aktivitást, csakúgy, mint a KVB egyik állatkísérletes modelljében (258). Az endotélsejtekben szintén megtalálhatók az S-adenozilmetionin-függő metiltranszferázok, melyek azokat a fehérjéket metilálják, melyekből következményesen ADMA és SDMA keletkezik a lebomlás során. E metiltranszferázok endotélsejtekben LDL-koleszterin hatására felregulálódik, és így megemelkedett ADMA termeléshez vezet (43). Talán a DDAH enzim aktivitásának defektusa, és/vagy a megemelkedett metiltranszferáz aktivitás további rizikó faktorok lehetnek a KVB progressziójában?

A legvalószínűbb, hogy sok faktor határozza meg, hogy NO hiány alakul-e ki a KVB-ben szenvedő betegben. Újabban leírták, hogy bizonyos vesebetegségekben az eNOS gén

polimorfizmusa állhat fenn, ami kapcsolatban lehet a vesefunkció romlásával (322). A KVB állatkísérletes tanulmányai az érrendszer és a vese csökkent eNOS expressziójáról számolnak be (294). A KVB-ban előforduló hiperparatireoidizmus hozzájárul a NOS aktivitás csökkenéséhez, mivel a paratireoidektómia és a kalcium csatorna blokkolók visszafordítják az NO csökkenést az érrendszerben (294). A KVB-ben a megemelkedett oxidatív stressz is hozzájárulhat a csökkent NOS aktivitáshoz, mivel az oxigén szabad gyökök inaktíválják a termelődött NO-t, és meggátolják a normális érrelaxációt (295). Idővel az oxidatív stressz nem-enzimatis glikációhoz és AGE produktumok oxidációjához és akkumulációjához vezet. Az AGE-k befolyásolják az érfal működését: “elfogják” az NO-t, így csökkentik az NO érrelaxációs hatását (és más agonistákét is, 56). Az AGE-k csökkentik is az eNOS-t endotheliumsejt-tenyészetben (62). Azon kívül, hogy a magas vérnyomás és ateroszklerózis kialakulásához hozzájárul az NO hiány, exacerbálhatja a háttérben álló vesebetegséget is (321), továbbá “de novo” vesebetegséget is okozhat, amit patkányokban írtak le (27).

Összefoglalva, a KVB-ben szenvedő betegekből származó plazmának különböző hatása lehet az eNOS aktivitásra *in vitro*, az ADMA koncentrációtól függően. Valószínűleg ez tükrözi az “*in vivo*” szituációt. A KVB korai fázisában előforduló magas plazma ADMA szint a VVE irányába, és/vagy a magas vérnyomás és ateroszklerózis okozta megnövekedett kardiovaszkuláris halálozás felé mutató rossz prognosztikai faktor lehet. Hogy miért emelkedett a plazma ADMA szint bizonyos betegeknél, még nem világos jelenleg, de mindenesetre nem magyarázza teljes egészében a vese klírenszenek csökkenése.

6.7. Az urea hatása endotheliumsejtek L-arg transzportjára és NOS aktivitására

Kísérleteink bizonyítják, hogy VVE-ben szenvedő betegekből származó urémiás plazma tartalmaz olyan anyago(ka)t, mely(ek) gátolja(ják) az L-arg transzportot (~20-30%-os gátlás) 3 féle, a vaszkuláris endotheliumból származó sejt típusba is. (A továbbiakban az egyszerűség kedvéért egyes számban taglaljuk a lehetséges faktorokat). A gátló faktor jelen van mind PD-vel, mind HD-vel kezelt betegeknél, így valószínűleg a veseelégtelenség következménye inkább, mint magának, a kezelés módjának. Ez a megfigyelés talán némi kiegyezést hoz a jelenleg ellentmondásosnak tűnő, a VVE-ben tapasztalható, csak szubnormális plazma L-arg szintek és a vese L-arg szintézisének jelentős visszaesése között VVE-ben (204, 248, 264, 265). A csökkent L-arg eltávolítás a plazmából (és a következményesen kevesebb L-arg felhasználás) megemelné a plazma L-arg szintet, és elfedné a csökkent L-arg hozzáférhetőséget. Ha azt vesszük, hogy csökkent mind a vese L-arg termelése, mind az L-arg transzportja az endotheliumsejtekbe VVE-ben, ez azt jelentheti,

hogy a normális és enyhén szubnormális plazma L-arg szintek VVE-ben tulajdonképpen igenis L-arg hiányt tükröznek. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az orotsav szintje (az L-arg hiány markere) megemelkedett uremiában (248).

A gátló anyag valószínűleg kis- vagy közép-molekulású, mivel a HD kezelés poliszulfon membránnal részlegesen eltávolítja. Korábbi tanulmányok leírták, hogy az endogén L-arg analóg ADMA elegendő mértékben halmozódik fel veseelégtelenségben ahhoz, hogy gátolni legyen képes a NOS enzimet, és hogy ezt az anyagot a HD kezelés eltávolítja (8, 74, 188, 230, 264, 265, 293). Mivel az ADMA-t a kationos aminoszporter rendszer az endotélsejtbe szállítja, ami az L-arg transzport fő útvonala is (77), megvizsgáltuk, hogy az urémiában is nagy koncentrációban előforduló ADMA okozhat-e transzport gátlást. Habár az urémiában előforduló nagyságrendű ADMA koncentráció (2-10 μM) képes gátolni az eNOS aktivitást (318), azt találtuk, hogy ezek a szintek túl alacsonyak ahhoz, hogy az L-arg transzportot befolyásolják, mivel kompetitív gátlást csak az ADMA farmakológiai koncentrációiban tudtunk kimutatni (100 μM).

Így, a VVE plazmában más faktor(ok)nak is jelen kell lennie (lenniük), amik felelősek az L-arg transzport gátlásáért, és a szintetikus oldatokkal végzett kísérleteink az urea szerepét hangsúlyozzák. Az urea a fehérjeanyagcsere végterméke, ami L-arg-ból L-orn mellett képződik, az argináz hatására (204). Az urea nem metabolizálódik tovább, egyenlően oszlik el a test vizeitében és a vizelettel választódik ki (248). Egészséges felnőtt emlősökben és állandó fehérjebevitel mellett a plazma és vizelet urea tartalma a vesefunkciót, a diétás protein bevitelt és a hidráltási állapotot tükrözi. Az urea VVE-ben felhalmozódik, a normális koncentráció akár ~5-10X-esére is. Bár konvencionálisan az ureát ártalmatlannak tekintik, bizonyítékok vannak arra, hogy nagy koncentrációban gátolhatja a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpát, a protein-szintézist, és számos más enzimet is, és általánosságban interferál a sejtek metabolizmusával (54, 92, 122, 174, 243). Adataink mutatják, hogy az urémiásokban előforduló koncentrációjú urea (25 mM) szignifikánsan gátolja az L-arg transzportot HDMVEC-be, 6 órás inkubáció után. Mivel más endotélsejtekben is hasonló megfigyeléseket tettünk (HGEC és BTAEC), kimondhatjuk, hogy az urea nagy extracelluláris koncentrációban általánosságban gátolja az L-arg transzportot a vaszkuláris endotéliumban. Megjegyzendő, hogy más transzport-gátló anyagoknak is kell lenniük urémiában, mivel *in vitro* jelentős gátló hatását észleltük VVE-ben szenvedőkből származó 20%-os humán plazmának, ami pl. ~5 mM ureának felelhet meg, míg a szintetikus oldatokban 5 mM ureának nem volt hatása az L-arg transzportra. Eddig még nem közölt adataink alapján a kreatininnek (880 μM) is van gátló hatása az L-

arg transzportra, 6 órás inkubáció után, illetve más gátló anyagok is jelen lehetnek. Elképzelhető, hogy az urémiás plazma egyes in vitro gátló faktorai együttesen, in vivo jelentősebb gátló hatást fejtenek ki az L-arg sejtek általi felvételére.

Korábbi tanulmányok sejtítették, hogy az urea kompetitíve gátolja számos enzim hatását a szubsztrát enzimhez való kötődésének megakadályozásával (243). Kísérleteink nem ezt támasztják alá, mivel az urea direkt hozzáadása a pufferhez nem gátolta akután az L-arg transzportot. Ha az urea bejut az endotélsejtbe, gátolhatja a volumen-szenzitív transzportereket (pl. Na⁺-H⁺ pumpa) „makromolekuláris zsúfoltság/tolongság” révén, ezáltal a pumpa nem specifikus gátlását okozva (223). Jelenleg még nem tudjuk eredményeinket molekuláris mechanizmusokkal magyarázni, habár az urea transzporterek jelenléte endotélsejt tenyészetben (299 = 30) felveti, hogy az urea intracellulárisan hathat. Megjegyzendő, hogy urémiások plazmája serkenti az L-arg transzportot vörösvértestekbe és vérlemezkékbe (196, 197), így az urea hatása különböző lehet különféle sejtekben.

Mi a jelentősége annak, hogy a magas koncentrációjú urea gátolni képes az endotél L-arg transzportert in vitro? Szignifikáns eNOS aktivitás csökkenést észleltünk 25 mM ureával 7 napos inkubáció után (de nem 6 órás után), ami egyértelműen nem a csökkent eNOS mennyiségre volt visszavezethető. Valószínűleg több, mint 6 órára van szükség, hogy az intracelluláris L-arg szint elegendően csökkenhessen ahhoz, hogy a szubsztrát hozzáférhetőség problémát jelentsen. Habár rendszerint nem gondolunk a csökkent szubsztrát hozzáférhetőségre, mint a konstitutív NO termelés lehetséges gátló tényezőjére, az L-arg depletált sejtek nem vesznek fel L-arg-t gyorsabban, mint az L-arg-nel telt sejtek (233), így nincs kompenzatórikus visszacsatolás, mely megakadályozza az intracelluláris L-arg koncentráció csökkenését. Krónikus urea kezelés hatására az intracelluláris L-arg koncentráció nem csökkent, és a számolt L-arg koncentrációk jelentősen az eNOS K_m értéke felett vannak (51). Bár, mivel a kationos aminosav transzporterek együtt fordulnak elő az eNOS-sal az endotélsejt kaveoláiban (193), lokális argininhiány léphet fel ebben a sejt-mikrokörnyezetben. Más szóval, inkább a lokális kaveoláris L-arg koncentráció, - amit a kationos aminosavtranszporterek határoznak meg -, mint a teljes intracelluláris L-arg koncentráció az, ami meghatározza az eNOS aktivitást, megmagyarázva az “arginin paradoxot” (193). A teljes intracelluláris L-arg koncentráció tükrözheti az intracelluláris L-arg szintézist, az L-arg enzimek (pl. argináz) által történő hasznosítását és/vagy az L-arg kijutását a sejtekből, más transzport rendszerek által. Így lehetséges, hogy a megemelkedett urea szint a vérben elősegítheti a magas vérnyomás kialakulását in vivo, az endotélsejtbe történő L-arg transzport gátlásán keresztül, és tulajdonképpen eNOS aktivitás csökkenésen

keresztül. Emellett, a magas urea koncentráció a vérben hozzájárulhat az immundiszfunkcióhoz VVE-ben, mivel leírták, hogy gátolja az NO termelést aktivált makrofágokban in vitro (232). Mivel az iNOS aktivitás függ a párhuzamosan felregulált membrán L-arg transzporterektől (45), a szubsztrát depléciójának szerepe lehet az urea- okozta iNOS gátlásban is.

Újabb kutatások alapján az urea urémiásokban észlelhető magas koncentrációjának nem-kompetitív gátló hatása az endotélisejtek L-arg-transzportjára (319) kivédhető az urea-transzporter gátlásával (299 = 30).

Összefoglalva, az urémiásokban előforduló koncentrációjú urea gátolhatja az L-arg transzportot endotélisejt tenyészetben és csökkentheti az eNOS aktivitását 7 napos inkubáció után. Ennek funkcionális jelentősége lehet VVE-ben, és hozzájárulhat az ezekben a betegekben észlelt alacsony NO termeléshez.

6.8. Az L-arg - NO útvonal in vivo vizsgálata állatokban - az urea hatása

Kísérletünk fő eredménye, hogy kimutatta: normál vesefunkció esetén az urémiásokban előforduló urea szint 7 nap alatt sem okoz változást a vérnyomásban, a vesehemodinamikában vagy az NO rendszerben. Munkánkhoz a motivációt az 5.2.6. fejezetben tárgyalt kísérlet adta, amiben kimutattuk, hogy az urea 7 napos inkubáció után gátolta az L-arg transzportot és az eNOS aktivitást endotélisejt tenyészetben. Hipotézisünk az volt, hogy a magas extracelluláris urea koncentráció az L-arg transzport gátlása révén intracelluláris L-arg hiányt okoz, és így gátolja az endotélium NO termelését, in vivo.

Megjegyzendő, hogy az urea nagy koncentrációban gátolja az iNOS aktivitást és az NO termelést stimulált makrofágokban (200, 232). Ennek a hatásnak lehet – legalábbis részben – szerepe a veseelégtelenségben tapasztalható immunszuppresszióban. Az előző fejezetben említettek és fenti adatokat összevetve azzal, hogy VVE-ben szenvedő betegekben csökken az NO termelés (264, 265), és hogy a magas urea szint gátolja az L-arg transzportot az endotéliumba (319), láttuk érdemesnek megvizsgálni, hogy van-e szerepe a magas plazma urea koncentrációnak normális veseműködés esetén.

Az urea L-arg-NO rendszerre történő közvetlen hatásának vizsgálatához in vivo kísérleteket terveztünk: néztük a vérnyomást, vesefunkciót és a 24 órás gyűjtött vizeletből a NO_x ürítést. Ahhoz hogy a diétával a szervezetbe kerülő NO_x ne zavarja a U_{NO_xV} mérések eredményeit (29), az állatok alacsony nitrát tartalmú diétát kaptak. Így a 24 órás U_{NO_xV} értékelhető és a test teljes NO termelésének tükrözi. Feltételezésünkkel szemben, a 24 órás U_{NO_xV} nem csökkent elhúzódóan magas urea szint hatására, ami arra utal, hogy a totális

NO termelést (minden szöveti forrásból) nem befolyásolja az urémiásokban előforduló szintű urea önmagában. Sőt, kisfokú emelkedést láttunk a 24 órás U_{NOxV} -ben (és U_{pV} -ben) magas urea szint mellett. Vonakodunk attól, hogy ebből azt a következtetést vonjuk le, hogy az NO termelés befolyásolható urea etetéssel, a nagy mennyiségű urea renális tubuláris hatásait is figyelembe véve. Mivel ezeknek az állatoknak egészséges a veséje, az urea etetés a 7 napos periódus alatt profúz ozmotikus diurézist vált ki. Normál esetben a NO_x és a filtrált plazma fehérjék jelentős mértékben szívódnak vissza a proximális tubulusokban (282). Lehetséges, hogy a megnövekedett 24 órás U_{pV} és U_{NOxV} háttérében a feleslegben lévő, ozmotikusan ható, filtrált urea proximális tubulus-beli „kimosó” hatása áll. Az egyetlen különbség az akut NOS-gátlásra adott válaszban a magas urea-szintű állatokban a kontrollokhöz képest az volt, hogy a normál patkányokban észlelt nátrium kiválasztás növekedése (25, 26, 238) teljesen gátlódott urea hatására, az urea ozmotikus hatása okozta már eleve nagyobb vizelet-termelés mellett. Feltételezzük, hogy ez a hatás a magas plazma urea szint okozta ozmotikus diurézis egy másik arcát tükrözi normál vesefunkcióval rendelkező állatokban.

A 24 órás U_{NOxV} mutatja a teljes NO termelést, és mivel az eNOS termelte NO az össz-NO nak nagy valószínűséggel csak kis hányada, így az U_{NOxV} értékének csak alig van prediktív ereje az eNOS aktivitás változásának reflektálásában. Mivel az eNOS termelte NO tónusos vazodilatátor (25, 175), mértük a vérnyomást is. A krónikusan kanülált állatokban a 7 napig magas plazma urea szint nem befolyásolta az alap vérnyomást vagy a vesehemodinamikát. Továbbá, a magas urea szintű állatokban az akut NOS gátlásra bekövetkező presszor válasz sokkal robusztusabb volt, mint normál plazma urea szintű állatokban (25, 26, 238). Az ismertetett in vivo eredményeink, együtt az in vitro megfigyeléseinkkel, hogy a vese L-arg termelését, NOS aktivitását és eNOS fehérjemennyiségét nem befolyásolja 7 napig magas plazma urea szint, arra utalnak, hogy más, további faktorok is szükségesek in vivo ahhoz, hogy NO hiány alakuljon ki.

Következésképpen, az in vitro kísérleteinkkel (5.2.6. fejezet) ellentétben, in vivo 7 nap alatt a magas plazma urea szint nem okoz módszereinkkel detektálható NOS gátlást. Kísérleteinket normál vesefunkcióval rendelkező, egészséges patkányokon végeztük. Így, az endogén NOS-gátló anyagok kiválasztásra kerülnek, és az L-arg szintézise is optimális. Feltételezzük, hogy ha az L-arg ellátás nem megfelelő, és az endogén NOS inhibitorok klírensze csökkent (veseelégtelenségben), együtt az urea gátló hatásával az L-arg transzportra, csökkenhet az NO termelés.

6.9. Humán vizsgálatok - IgA nefropátia és hipertónia

Az IgA nefropátia a leggyakoribb primer krónikus glomerulonephritis forma. A betegek legnagyobb részében a betegség lassan progrediál és a betegség kezdete után 15-25 évvel krónikus veseelégtelenség kialakulása várható. A disszertáció célja, a betegség kialakulását illetve progresszióját előidéző tényezők vizsgálata és ezek alapján a lehető legoptimálisabb therápiás lehetőségek gyakorlatba való átvitele volt.

6.9.1. Endotelialis vasoactiv anyagok; a dohányzás hatása

Ismert, hogy a szervezetben keletkezett NO és a vizelettel ürített NOx kapcsolatát számos tényező befolyásolhatja (táplálék, ivóvíz NOx tartalma, fizikai aktivitás stb., 28, 29). Ezek mellett vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a vizelet bakteriális fertőzöttsége is megváltoztatja annak NO₂⁻/NO₃⁻ tartalmát. Ezért csak a steril körülmények között gyűjtött, bakteriológiailag sterilnek bizonyult vizeletminták NOx tartalmából következtethetünk a szervezetben képződött NO mennyiségére.

Más eredményéhez hasonlóan, a 24 órás gyűjtött vizeletből meghatározott NOx és cGMP között megfigyelt összefüggés alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy mindkettő döntően a szervezetben keletkezett NO hatására illetve lebomlásaként keletkezett, melyhez hasonló megfigyelést tettek Kanno és munkatársai egészséges önkéntesek L-arg infúzió alatt kiválasztott vizeletének vizsgálatával (137). Kísérletes glomerulonephritisben a glomeruláris iNOS indukció és a vizelettel ürített NOx mennyisége között nem volt szignifikáns kapcsolat (269). Az általunk vizsgált IgA nefropátiás betegek vizelet NOx illetve cGMP ürítései sem voltak magasabbak a kontroll csoporténál, ami arra utal, hogy a NOx illetve cGMP elsősorban nem a veseszövetek iNOS aktivációjából származik.

Esszenciális hipertóniásokban csökken a NO kiváltotta vazodilatáció, mely a szervezetben termelődő NO és vérnyomás közötti kapcsolatra utal, melyet megerősítenek az IgA nefropátiás betegeinkben megfigyelt NOx ürítés és a 24 órás vérnyomásátlagok közötti szignifikáns kapcsolat (222).

Ismert, hogy az NO gátolja az ET keletkezését és az ET rövid ideig, hatása elején NO termelődést, és így vazodilatációt okoz (125). Tehát az erek tónusának szabályozásában résztvevő ellentétes hatású mediátorok között is jelentős bioreguláció áll fenn. Valószínűleg ennek következménye az egészséges kontrollok vizelet NOx és ET ürítés között megfigyelt szignifikáns kapcsolat. Ezt azonban az IgA nefropátiás betegeinkben nem tudtuk kimutatni,

még normális vesefunkciójú betegekben sem, mely arra utal, hogy IgA nefropátiában a vasoactiv mediatorok termelődése és összehangolt működése már a betegség korai stádiumában károsodik. Ezt támogatja az IgA nefropátiásokban megfigyelt szignifikánsan emelkedett ET/NO_x hányados is.

Az ateroszklerotikus endotélsejtek sejtek NO termelése csökkent (94). Valószínűleg ennek következménye, hogy az életkor növekedésével a vizelet NO_x tartalmának, azaz a szervezet NO termelésének csökkenése.

A cigaretta égése során jelentős mennyiségű nitrogén származék keletkezik, melyek a légutakon keresztül bejuthatnak a szervezetbe (110). Mind a dohányos egészséges, mind a dohányos IgA nefropátiásokban észlelt szignifikánsan megnövekedett NO_x kiválasztás illetve a vizelet NO_x és cGMP között hiányzó összefüggés alapján feltételezzük, hogy a dohányzás kapcsán jelentős mennyiségű NO vagy NO_x jut a szervezetbe.

Az NO felfedezésével egy, a klinikai gyakorlatban már több mint 100 éve alkalmazott gyógyszer – a szerves nitrátok - hatásmechanizmusát érthettük meg (201). Az ischaemias szívbetegség miatt szerves nitrát terápiaiban részesülő IgA nefropátiás betegeinknél észlelt magasabb NO_x kiválasztás ezen gyógyszerekből való NO felszabadulást feltételezi.

6.9.2. Ambuláns vérnyomásmonitorozás

Az elmúlt években az ambuláns vérnyomásmonitorozás elterjedése jelentősen segítette a hipertónia betegség felismerését és optimális kezelését, melyről már magyar nyelvű monográfia is megjelent (88). Eredményeink alapján az ambuláns vérnyomásmonitorozás szükségesnek látszik a secunder, renoparenchymas hipertóniak, így az IgA nefropátiások hipertóniájának korai felismerésében és kezelésében. Az IgA nefropátiában a kialakuló magasvérnyomás egyik előjele lehet a napszaki vérnyomásingadozás megszűnése. Adataink szerint a napjainkban használt antihypertensiv gyógyszerek nem tudják a vérnyomás napszaki ritmusát helyreállítani. Timio és munkatársainak megfigyelése szerint krónikus glomerulonephritisben, ha az éjszakai vérnyomáscsökkenés elmarad, a creatinin clearance csökkenése gyorsabb (284). Saját követéses adataink szerint is nem csak a hipertóniás IgA nefropátiás betegekben, hanem már a non-dipperekben illetve a fehérköpeny hipertóniát mutató betegekben is gyorsabb a vesebetegség progressiója.

6.9.3. Terápia

Gansevoort és munkatársainak metaanalíziséből ismert, hogy a különböző támadáspontú vérnyomáscsökkentők (ACE gátlók, CCB-k, béta blokkolók stb.) azonos vérnyomáscsökkentő hatás mellett nem egyforma mértékben befolyásolják a krónikus glomerulonephritisben szenvedők proteinuriáját, melynek prognosztikai szerepe ismert (100). Adataink szerint a hosszabb ideig ható (naponta csak 1-2x adandó) ACE gátlók és CCB-k használatával mind a proteinuria mértéke mind a vesebetegség progressziója lassítható volt. A hosszabb hatású antihypertensiv szerek kedvező hatásáért valószínűleg a jobb vérnyomásprofil, illetve a kevesebb szeri gyógyszerbevitelből származó jobb compliance lehet a felelős.

7. EGY LEHETSÉGES JÖVŐKÉP - Az L-arg adásának és megszorításának hatása egészséges és beteg vesére (publikáció 16)

7.1. L-arg és normál vese

7.1.1. L-arg adagolás és megvonás hatása normál vesére

Hat napig L-arg-mentes vagy L-arg-ban gazdag diétát kapó egészséges felnőtt férfiak plazma L-arg-szintjében nincs eltérés 3 órás éhezési periódus után. Ezzel szemben, az L-arg-szegény étrendet fogyasztók plazma L-arg-szintje a 3 órás éhezést követő 5 órás étkezési periódus alatt szignifikánsan alacsonyabb az L-arg-ban gazdag étrendet fogyasztókéhoz viszonyítva, illetve L-cit szintjük magasabb. A de novo L-arg-szintézis az L-arg-beviteltől függetlennek bizonyult (58). A 6 napos éhezés nem változtatja meg a teljestest NO szintézist sem (59).

Egészséges felnőttekben L-arg infúzió (1 g/perc, 30 percig) szignifikánsan csökkenti mind a szisztolés, mind a diasztolés vérnyomást, a trombocita-aggregációt, a vérviszkozitást, és növeli az alsó végtag vérátáramlását, a szívfrekvenciát és a plazma katekolamin-szinteket (104). A jelenség mechanizmusáért - legalábbis részben - az endogéne elválasztott inzulint teszik felelőssé, másrészt, mivel a NOS elsősorban a sejtmembrán kaveoláihoz asszociáltn fordul elő, ebben a "védett" mikrokörnyezetben, kompartmentben az L-arg koncentrációja különbözhet a sejt teljes L-arg koncentrációjától (104, 162), ami az "arginin paradox" jelenség mechanizmusára utalhat. Mások ugyanilyen dózisban alkalmazott L-arg infúzió (15 perc alatt) esetén nem írtak le vérnyomásváltozást, viszont megemelkedett NO_x és cGMP kiválasztást, szintén emelkedett plazma inzulin szintet, illetve magas sóbevitel esetén megemelkedett és alacsony sóbevitel esetén csökkent vizelettel történő nátrium-kiválasztást közöltek egészségesekben (22).

A diétás L-arg bevitelt körülbelül duplájára növelve, csökken a vérnyomás, kisfokban emelkedik a GFR és jelentősen csökken az éhgyomri vércukorszint egészséges egyéneknél (271).

7.1.2. L-arg antagonisták hatása normál vesére

Az L-NMA és L-NAME (N^ω-nitro-L-arginin metilészter) akut és krónikus adagolásban, kis és nagy dózisban is befolyásolja a vese hemodinamikáját, bizonyítva az NO fontos szerepét a lokális keringésben is.

A NOS szisztémás gátlását többféle L-arg antagonistával lehet elérni. Ezek hatására vérnyomásemelkedés, intenzív renális vazokonstriktió, kifejezett vese plazmaáramlás

csökkenés és kismértékű GFR csökkenés jön létre éber és altatott állatokban. Emellett a vese mikrocirkuláció szintjén az afferens és efferens arteriolák vazokonstrikciónak, és a szisztémás vérnyomás-emelkedéssel együtt a glomeruláris nyomás kifejezett emelkedéséhez vezet, a K_f csökkentésével együtt.

Akut lokális intrarenális vagy kis dózisú szisztémás NOS gátlás vese vazokonstrikciónak eredményez, vérnyomás-emelkedés nélkül. A vese mikrocirkulációban az afferens arteriola konstrikciónak hozza létre, az efferens arteriola tónusának megváltoztatása nélkül, a K_f csökkenés megtartottsága mellett.

Krónikus L-NAME adagolás hipertóniát és glomeruloszklerózist okoz (27, 325).

7.2. L-arg és vesebetegség

7.2.1. Vesebetegség és L-arg hiány

Vesebetegség esetén gyakran megváltozik az L-arg metabolizmusa a normálshoz képest, melyet a betegség típusa, stádiuma is befolyásol. Experimentális aktív Heyman nephritisben például kimutatták, hogy az infiltráló makrofágok a glomerulusokban nitritet termelnek (60). Experimentálisan indukált glomerulonephritises veséből izolált glomerulusokban kompetíció folyik az L-arg-ért az argináz és a NOS között (133), a nephritises glomerulusokból izolált makrofágok az NO fő forrásai, míg a mezangiális sejtek argináz aktivitása emelkedett, és kevésbé van szerepük az NO termelésében (69). Immunmediált glomerulonephritisben az iNOS indukciója mellett a szintén megemelkedett argináz és ODK aktivitás miatt nő a poliamin-szintézis, ami sejtproliferációt okoz, illetve az ornitin aminotranszferáz enzim fokozott aktivitása miatt nő a L-pro termelés is, ami a kollagénszintézist serkenti. Így mindhárom út "fogyasztja" az L-arg-t ebben a modellben (142).

Felmerült, hogy a humán vese a kísérletes glomerulonephritises patkány modellhez hasonló választ mutat-e az iNOS indukció kapcsán. Humán makrofágok vagy monociták nem vagy alig reagálnak in vitro lipopoliszaccharidokra vagy citokinekre, mint pl. interferon- γ , vagy tumor nekrosis faktor- α , bár számos humán betegség kapcsán kimutatták az iNOS expresszióját és a következményesen megemelkedett NO szintézist (225, 226). Mások az iNOS megnövekedett expresszióját és a megemelkedett iNOS protein mennyiséget írták le mezangioproliferatív glomerulonephritisben (IgA nefropátia és non-IgA mezangioproliferatív glomerulonephritis) szenvedő betegekben: nem csak makrofágokban, hanem vesesejtekben (mezangium) is, sőt az iNOS expresszió korrelált a vesekárosodás súlyosságával, csakúgy mint a veseműködés csökkenésének fokával (98,

138). Továbbá, humán anyagon végzett immuno-hisztokémiai vizsgálatok bizonyították, hogy a glomerulusok károsodása együtt jár az eNOS csökkenésével is az iNOS növekedése mellett IgA nephropátiában és lupusz nephritisben (98). Ezzel szemben mások leírták az eNOS glomeruláris és tubulointersticiális expressziójának növekedését IgA nephropátiában, fokális glomeruloszklerózisban, membranoproliferatív glomerulonephritisben, gyors progressziójú glomerulonephritisben, akut és krónikus transzplantátum reakcióban (128).

Krónikus veseelégtelenség esetén a vese L-cit felvétele és L-arg termelése csökkent, így a plazma citrullin a veseelégtelenség fokával párhuzamosan megemelkedik, viszont az L-arg plazma koncentrációja a normál határokon belül marad (285, 163, 188, 167). Urémiában a fokozott izom katabolizmus igyekszik fenntartani a normál plazma L-arg szintet, mivel a vese nem képes elegendő szintézisre (vagy egyáltalán nem tud L-arg-t termelni). Emiatt célszerűnek tűnhet krónikus veseelégtelenségben a diétás L-arg bevitel fokozása (248). Továbbá, több tanulmány utal az NO hiányra krónikus vesebetegség állatkísérletes modelljeiben (84, 248, 249, 294, 298), és humán vizsgálatokban is (38, 157, 263, 307). Bár mások beszámolnak a szisztémás NO szintézis fokozott voltáról a vese NO szintézisének csökkenése mellett krónikus veseelégtelenségben (4, 5, 6), e közlemények eredménye elgondolkodtató, amennyiben az NO szintézis mértékét a plazma NO_x szint alapján állapítják meg, aminek kiválasztása ugyanis veseelégtelenségben a romló vesefunkció miatt csökken. Utóbbit támogatja viszont az a megfigyelés, miszerint urémiás betegekből nyert plazma NO termelést indukál az iNOS-on keresztül, mely felelős lehet az ezekben a betegekben megfigyelt trombocita-diszfunkcióért és – legalábbis részben - a dialízis hipotenzióért (218). Ezzel szemben már Vallance és munkatársai (293) leírták az ADMA jelenlétét és NOS gátló hatását végstádiumú vesebetegségben, illetve később mások is leírták az urémiás plazma endotélsejtek NOS aktivitását gátló hatását (318). Egy lehetséges magyarázat a különböző eredményekre, hogy Vallance és munkatársai (293) betegeiben alacsonyabb plazma L-arg szinteket mértek, mint Norris és munkatársai (218), és az iNOS aktivitása jelentősen függ az extracelluláris L-arg hozzáférhetőségétől (217). Tovább bonyolítja a képet, hogy más szerzők leírták az urémiás plazma mind NOS-t aktiváló (plazma minták kb. 20%-a), mind gátló hatását (plazma minták kb. 80%-a; 12), így a kérdés egyenlőre nyitott.

Összegezve, az urémia többféle úton is befolyásolja az L-arg metabolizmusának egyik legfontosabb útvonalát, az NO termelődést és aktivitást (40. ábra): (1.) A szisztémás hipertónia és/vagy ateroszklerotikus elváltozások csökkentik az endotélium NO termelését. (2.) A csökkent vesetömeg limitálhatja az L-arg szintézist. (3.) A megemelkedett citokin-

termelés krónikusan indukálja az iNOS-t. (4.) A termelő és csökkent kiválasztódású L-arg analógok kompetitíve gátolják a NOS enzimet. (5.) A sejtek redox státusza befolyásolja az NO fizikai állapotát, ezáltal a funkcionális aktivitását: az NO oxidálódhat (NO^+), vagy redukálódhat (NO^-), így az effektív diffúziós távolsága megváltozik (36). Végeredményben a veseelégtelenség, súlyosságától (kreatinin klírensz csökkenése) függően, csökkent NO termeléssel jár (38).

Az L-arg hiány mértéke lehet abszolút: a normál plazma és szöveti szinteknél alacsonyabb L-arg koncentráció (emberben nem jellemző a plazma L-arg szint szignifikáns csökkenése), és lehet relatív: a plazma L-arg a normális határokon belüli. Mindkét esetben az orotsav kiválasztása a normálisnál nagyobb mértékű. Az orotsav, a pirimidin anyagszere metabolitja, a tubulusokban aktívan választódik ki, és mennyisége akkor emelkedik meg (mind a plazmában, mind a vizeletben), amikor a májban az urea szintéziséhez nincs elegendő L-arg, így a protein metabolizmusból származó ammónia több lépésen keresztül, az urea-ciklust megkerülve, orotsavvá alakul (248). Veseelégtelenségben szenvedő dializált betegekben a plazma orotsav mennyisége többszöröse a kontrollokénak, és a hemodialízis sem csökkenti az orotsavat normál szintre, bár jelentősen redukálja azt. A megemelkedett orotsav szint hosszútávon zsírsavanyagcsere-zavart, a májban zsíros infiltrációt okozhat és karcinogén szerepe is bizonyított (74).

Kísérletesen abszolút L-arg hiány léphet fel obstruktív nephropátiás modellben és experimentális diabetesben, míg relatív L-arg hiány jelentkezik fehérjedús diétát fogyasztó patkányokban és 5/6-od nefrektómia után (248, 249, 251).

7.2.2. L-arg adagolás / restriktio és vesebetegség

7.2.2.1. Állatkísérletek

a.) Obstruktív nefropátia

Experimentális ureter leköttést követően jelentősen csökken a vese plazmaáramlás és a GFR. Az obstrukció a vesében makrofágok akut infiltrációját (néhány órán belül meginduló és 2-5 nap között tetőző) is okozza, illetve tartós elzáródás intersticiális fibrózishoz vezet. Patkányokban csökken a plazma- és a vese L-arg szintje (30-50%-kal), csökken a NO_x kiválasztás, az iNOS felregulálódik a vesehemodinamika fenntartása érdekében, így L-arg hiány lép fel, ami vazokonstriktiót eredményez. Az obliterációt megelőző L-arg adagolás a plazmaáramlás és a GFR csaknem teljes visszaállításával jár a leköttetés megszüntetése után, csökken a makrofágok intersticiális infiltrációja, az

intersticiális térfogat és a kollagénszintézis is (150, 249).

b.) Szubtotális nefrektómia

A szubtotális nefrektómia (egyik oldali vese eltávolítása + másik vese egy részének eltávolítása, összesen 60-90%-os veseállománycsökkenés) progresszív krónikus veseelégtelenséghez vezet hipertóniával, proteinuriával, csökkent NO_x kiválasztással. A maradék vese hipertrófiázal, és adaptíve a maradék nephronokban több L-arg szintetizálódik, mint a teljes vese esetén, mégsem elegendő a keletkezett L-arg mennyisége. A kompenzatórikus fokozott izomlebomlás is igyekszik normál határok között tartani a plazma L-arg szintet. L-arg adagolás (1%-os L-arg patkányok ivóvizébe) csökkenti a szubtotális nefrektómia okozta glomeruláris hipertóniát (az emelkedett glomeruláris kapilláris nyomást, a megnövekedett efferens arteriola rezisztenciát, a csökkent filtrációs koefficienset), így javítja a GFR-t, növeli a PAH-klírenszet, csökkenti a proteinuriát, növeli az épen maradó glomerulusok számát, csökkenti az intersticiális károsodás mértékét, a sejtproliferációt a maradék vese glomerulusaiban, tehát csökkenti a progressziót. A vérnyomásemelkedést nem, vagy nem teljesen védi ki a fokozott diétás L-arg bevitel (14, 129, 139, 251). NO-donor, captopril és lisinopril is renoprotektívnek bizonyultak, viszont captopril és L-arg együttes alkalmazása nem eredményezett további javulást (14, 33).

c.) Ciklosporin A nephrotoxicitás

A ciklosporin A az afferens arteriola rezisztenciájának szignifikáns emelkedését okozza patkányokban. Diétás L-arg adagolás ezekben az állatokban GFR és SNGFR emelkedést eredményez (248).

d.) Szisztémás magas vérnyomás

Diétás L-arg adagolás a szisztémás magas vérnyomás bizonyos formáiban jótékony hatású lehet, de nem mindegyikben. A Dahl/Rapp sószenszítív hipertóniában szenvedő patkányok magas sóbevitel mellett súlyos hipertóniában szenvednek, GFR csökkenéssel és glomeruloszklerózissal. L-arg adagolás ezeket az elváltozásokat kivédi.

Ellenben uninefektomizált állatok deoxikortikoszteronnal történő kezelése után, magas sóbevitel mellett a hipertóniát nem előzte meg az L-arg (248).

e.) Experimentális diabetes

Streptozotocin okozta diabézes megemelkedett GFR-rel, glomeruláris hiperfiltrációval és hipertóniával jár, következményes vese hipertóniával, proteinuriával.

Ebben a modellben az L-arg-ból keletkező NO mennyisége nőhet, amire a csökkent plazma L-arg szint (ami nem magyarázható teljesen a vizelettel történő L-arg vesztéssel), az emelkedett NO_x és cGMP kiválasztás is utal. Az NO út aktiválódásának, mint vazodilatátor hatásnak, szerepe lehet a hiperfiltráció keletkezésében. Aminoguanidin, az iNOS szelektív inhibitora csökkenti az albuminuriát és a mezangiális expanziót (bár az aminoguanidin gátolja az előrehaladott glikációs végtermékek NO-t megkötő hatását is, és ez a hatás valószínűleg fontosabb). Másrészt az L-arg - NO útvonal aktiválódása másodlagos is lehet: kompenzatorikus folyamat, a vazokonstriktorokkal, glikozilált végtermékekkel és trombogén anyagokkal szemben, illetve az abnormális érproliferáció ellenében hatva. L-arg adagolás megelőzi a glomeruláris hiperfiltrációt és csökkenti a proteinuriát (150, 247, 248).

f.) Puromicin aminonukleozid indukálta nefrózis

Puromicin aminonukleozid egyszeri injekciója a glomeruláris epitél toxikus károsodását és a GBM permeabilitásának fokozódását okozza, mely nefrózis szindróma kialakulásához vezet. Diétás L-arg adagolás az injekciót megelőzően 3 nappal elkezdve és utána még 10 napig adagolva csökkenti a veseparenchima makrofágok általi infiltrációját (248).

g.) Magas fehérjetartalmú diéta

A magas fehérjetartalmú diéta növeli a GFR-t, a vese hipertófiáját okozhatja és hosszútávú alkalmazás esetén glomeruloszklerózishoz vezethet. Ezalatt relatív L-arg hiány is felléphet. Diétás L-arg adagolás (ivóvízben, 1%, 1 hónapig) csökkenti a vesetömeg növekedését, meggátolja a vese hipertófiáját, csökkenti az orotsav kiválasztását a vizeletbe. Mindezek arra utalnak, hogy az L-arg megelőzheti a magas protein tartalmú diéta káros hatásait (250).

h.) Anti-thymocyta szérum okozta experimentális mesangioproliferatív glomerulonephritis

Az anti-thymocyta szérum (ATSZ) injekció a glomeruláris mesangium komplement mediálta lízisét okozza (ez a károsodás szaka, vagy kezdeti szakasz), aminek fő mediátora az átmenetileg indukált iNOS által termelt nagy mennyiségű NO. Erre utal az ekkor tapasztalható csökkent plazma L-arg szint és megemelkedett plazma NO_x. Ezt követi a TGF-β szint jelentős emelkedése (a TGF-β a betegség fő markere), szöveti fibrotizáló folyamatokkal, az extracelluláris mátrix expanziójával ("repair", regenerációs fázis).

Az immun-mediált betegség kezdeti szakában (károsodás szaka) az L-arg-ban

szegény étrend (mind az ATSZ injekciót megelőző L-arg bevitel korlátozása, mind az injekció után 1 napon belül adott L-arg szegény étrend) csökkenti a proteinuriát, TGF- β 1 fehérje expressziót, mátrix-képződést, mátrix-lerakódást és mezangiolízist. Az alacsony fehérjetartalmú diéta szintén jótékony hatású ebben a modellben, bár kétséges, hogy a hatás az iNOS szubsztrát-hozzáférhetőség csökkentése révén következik-e be. L-arg adagolása kifejezetten káros: az iNOS indukálódik, így emelkedik az NO termelés és megnő a következményes mezangiolízis. Az NO aktív szövetdestruktív hatására utal a nitrotirozin képződésének kimutatása immunhisztokémiai módszerrel. A nitrotirozin peroxinitrit (mely NO-ból és szuperoxid anionból keletkezik) és fehérjékből származó tirozin reakciója kapcsán keletkezik

A szintén megemelkedett argináz és ODK aktivitás miatt nő a poliamin-szintézis, ami sejtproliferációt okoz, illetve az ornitin aminotranszferáz enzim fokozott aktivitása miatt nő a L-pro termelés is, ami a kollagénszintézist serkenti. Az L-arg szegény diéta jótékony hatása e folyamatok szubsztrát limitáltságát tükrözi.

Ezzel szemben, a betegség indukciója után megkezdett L-arg adagolás csökkenti a fibrotikus reakciót, bár nem sikerült bizonyítani, hogy a szöveti kép javulása az NO termelés növelésén keresztül jelentkezik, és így valószínűbb, hogy a hatást egyéb utak aktiválása hozza létre. Mindenesetre a TGF- β expressziója és termelődése jelentősen csökken (ami az antifibrotikus hatás jó fokmérőjének tűnik) L-arg adagolás hatására a regenerációs fázisban. Továbbá, az alacsony fehérjetartalmú diéta és az L-arg adagolás együttesen kiegészítő additív terapeutikus hatást mutatnak a regenerációs fázisban (142, 212, 213, 225, 226, 227).

7.2.2.2. Humán vizsgálatok

a.) Diétás és parenterális L-arg adagolás

Gyermekek intersticiális nephritisében és krónikus veseelégtelenségében 2 hónapig tartó diétás L-arg szupplementáció antiproteinuriás hatásúnak bizonyult (68). Hasonlóan, krónikus glomerulonephritisben szenvedő betegekben (csökkent GFR-rel) akut L-arg infúzió szignifikánsan csökkentette a proteinuriát, de nem befolyásolta a szisztémás- és vese hemodinamikát (311).

Cianciaruso és munkatársai (67) randomizált, dupla-vak, placebo-kontrolált kísérletben vizsgálták az orális L-arg adagolás (0,2 g/kg/nap, 6 hónapig) hatását mérsékelt súlyos veseelégtelenségben, és azt találták, hogy a nem szupplementált betegekhez viszonyítva az NO termelés növekedése nem okozott változást a GFR-ben és a

proteinuria mértékében. Az L-arg szupplementáció jelentős növekedést okozott viszont a plazma karbamid nitrogén- és L-arg szintjében és növelte a vizelettel ürített NO_x mennyiséget is, illetve rontotta a metabolikus acidózist. Az urea szintjének megemelkedése az argináz útvonal aktiválódására utal, így antiszklerotikus (NO) és proszklerotikus (L-orn) utak szimultán aktiválódását figyelték meg. Összegezve, ezekben a betegekben valószínűleg az NO termelés növekedése nem volt elegendő ahhoz, hogy antagonizálja az angiotenzin II hatását és csökkentse a proteinuriát (217). Később ugyanezen kutatócsoport (216), több beteggel és kontrollok bevonásával kiterjesztett vizsgálatok során részben megerősítette a korábbi eredményeket, részben átértékelte azokat: nem találtak fokozott mértékű NO_x kiválasztást a megemelkedett plazma NO_x szint mellett (tehát megtartott NO szintézis és a végtermék - NO_x - retenciója). L-arg-nel nem stimulált betegekben az NO termelés konstans volt, és az L-arg szupplementált betegekben sem növekedett, így a vesebetegség prognózisát nem befolyásolta az L-arg. Továbbá beszámoltak az L-arg szupplementáció direkt aktiváló hatásáról a renin-angiotenzin rendszerre (plazma renin aktivitás megemelkedése a hidráltság változása nélkül).

Nakayama és munkatársai (211) az L-arg (500 mg/kg, 30 percre) infúzió vérnyomáscsökkentő és plazma L-arg- és L-cit szintet növelő hatásáról számoltak be krónikusan dializált betegekben (alapbetegség: glomerulonephritis) és egészséges kontrollokban. A két csoportban észlelt változások között nem volt eltérés.

Hand és munkatársai (113) krónikus hemodialízissel kezelt veseelégtelenségben szenvedő betegek noradrenalin előzetesen kontrahált kézháti vénáin vizsgálták a lokálisan aktív dózisú acetilkolin hatását, és azt találták, hogy az L-arg (de nem a D-arg) koinfúziója vagy ugyanígy a hemodialízis helyreállította az acetilkolin adás okozta venodilatációt.

Matsushita és munkatársai (189) teljes parenterális táplálásban részesülő (glükóz és esszenciális aminosavak), krónikus veseelégtelenség miatt dializált két betegnek adtak L-arg-t (összesen 100 mg/nap bevitel), több mint egy hónapig. Az L-arg adagolás javította a betegség miatt felborult urea ciklust, de jelentősen csökkentette a betegek vérnyomását is.

b.) Diétás fehérje megszorítás

Bár a diétás fehérjemegszorítás nem feltétlenül összehasonlítható a diétás L-arg megszorítással, mégis közös mindkettőben a csökkent L-arg bevitel. A „Modification of Diet in Renal Disease” tanulmány az alacsony fehérjebevitel protektív hatásáról számol be mérsékelt fokú veseelégtelenségben szenvedő betegekben (151). A tanulmány

újraértékelése (171) a súlyos veseelégtelenségben szenvedő betegekben is jótékony hatásúnak találta a fehérjebevitel megszorítását, bár a betegek közül sokan ACE-gátló terápiában is részesültek a protein restrikció mellett. A kétféle terápia hatása összefügghet, bizonyítja ezt az a tény is, hogy a renin-angiotenzin rendszer aktivitása függ a fehérjebeviteltől (228).

7.2.3. Az L-arg adagolással kapcsolatos egyéb eredmények

Az L-arg adagolás megelőzi a magas koleszterin-bevitel okozta aterogén hatásokat nyulakban, illetve javítja hiperkoleszterinémiás egyéneknél kolinergikumokra létrejövő vazodilatatív választ az alkari keringésben, illetve a koronáriákban (248). Ezt tűnik alátámasztani az a tény is, hogy feleslegben adott L-arg megelőzi az LDL szuperoxid anion termelődést serkentő hatását endotélsejteken (234). A korábban növekedési hormon szekréció tesztjeként használt intravénás L-arg adás urémiás betegekben veszélyes hiperkalémiát okozhat, mely hatás valószínűleg a kationos L-arg és az intracelluláris kálium kicserélődésének következménye (119).

Intravénás L-arg adagolás (500 mg/kg, 30 percig), magas sótartalmú diétát fogyasztó, sószenzitív, enyhe fokú esszenciális hipertóniásokban kisebb mértékű renális vaszkuláris rezisztencia csökkenést okoz, mint alacsony sótartalmú diéta esetén. A nem-sószenzitív betegekben a diéta sótartalmának változása nem befolyásolja az L-arg renális erekre kifejtett hatását (120).

L-arg adagolás mind állatkísérletekben, mind embereknél segíti a sebgyógyulást (141).

Az életkor előrehaladtával a szérumban L-arg szintje és a vizelettel kiválasztott NO_x csökken patkányokban, míg a proteinuria fokozódik. L-arg folyamatos diétás adása megelőzi az életkor-függő vesefunkció-romlást patkányokban: csökkenti a proteinuriát és a szklerotikus glomerulusok számát, míg növeli a GFR-t és a vizelettel kiválasztott NO_x mennyiségét. Megemlítendő, hogy az L-arg adagolás elhagyása után a szérumban L-arg szintje és a proteinuria visszaáll az eredeti értékekre (244, 245).

7.3. Összefoglalás

Az L-arg metabolizmusának átrendeződése vesebetegségben komplex folyamat, melyet sokminden befolyásol. Hogy csak néhány jelentősebbet említsünk: az iNOS indukció sejtdestrukciónak vezet, az eNOS mennyiségének csökkenése és működésének gátlása a glomeruláris hemodinamika és veseáramlás károsodásával jár, a poliaminszintézis

növekedése sejtprolifrációt eredményez, míg az aktívabb L-pro szintézis a kollagén termelődésének fokozódását okozza, így a fibrózist segíti elő.

Vesebetegségben fokozott L-arg igény esetén relatív, ritkán abszolút L-arg hiány is előfordulhat.

A krónikus veseelégtelenség NO deficiens állapotnak tűnik; a kisebb veseállomány az L-arg szintézisének csökkenésével jár. A krónikus veseelégtelenséghez vezető út sokféle lehet, így például a kezdetben NO túltermeléssel járó elváltozás is - progresszió során - ebbe torkollhat.

Az eddigi tanulmányok alapján a vesebetegség típusától, lefolyásától, stádiumától is függ, hogy a diétás L-arg adás vagy ennek megszorítása lehet-e célszerű. Mindezek figyelembevételével, ellentmondásos eredményeket közöltek. Az NO Janus-arcú viselkedése miatt is (152) fokozott óvatosságra intenek az L-arg terápiás alkalmazását illetően vesebetegségekben (143). A mind magas vérnyomással, mind megnövekedett intraglomeruláris nyomással járó experimentális vesebetegségekben jótékony hatásúnak tűnik az L-arg adagolás, csakúgy, mint azokban a modellekben (obstruktív nefropátia, aminonukleozid indukálta nefrózis szindróma), ahol a makrofágok infiltrációját is csökkenti a GFR és a vese plazmaáramlás javítása mellett (150).

Az L-arg humán alkalmazását illetően egyelőre nincs egységes döntés. További kontrollált, nagyobb esetszámú tanulmányokra van szükség, melyeket egy adott betegségre, és annak stádiumaira is specifikusan megterveznek.

8. ZÁRSZÓ

Az egyszeri, többszöri, vagy netán folyamatos vesekárosító hatások révén, amikor a vese kompenzációs mechanizmusai kimerülnek, funkcionális vesekárosodás jön létre. Ez a károsodás NO-hiányhoz vezet, akkor is, ha a kezdeti vesebetegség NO-túltermeléssel jár (pl. immun-mediált glomerulonephritis akut fázisában). Az NO-hiány viszont további funkcionális vesekárosodást eredményez, ami beindít egy ördögi kört (41. ábra): a vesebetegség progresszióját (amit természetesen más, itt részletesen nem említett faktorok is befolyásolnak). A progresszió krónikus vesebetegséghez, hipertónia kialakulásához vezet, melyek végül végstádiumú vesebetegségbe torkollhatnak, amikor a vesebeteg már művesekezésre, illetve vesetranszplantációra szorul. E progresszív folyamat megismerése és befolyásolása (lassítása, megakadályozása, netán megelőzése, illetve visszafordítása) a nephrologia kulcsfeladata.

9. TÉZISEK - ÚJ EREDMÉNYEK

Endotélsejtek intakt L-arg - NO rendszere in vitro

- I. A patkány mezentérium mikrocirkulációjából származó venuláris endotélsejtek több eNOS izoenzimmel, nagyobb NOS aktivitással, magasabb L-arg koncentrációval rendelkeznek, mint az arterioláris endotélsejtek. Az L-arg transzportjában nincs különbség a két sejttípus között. A különbség in vivo is kimutatható. L-NMA mindkét sejttípusban csökkenti a NOS aktivitást és növeli az intracelluláris L-arg koncentrációt.

A dohányfüst hatása az NO-cGMP útvonalra: cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modellben

- II. Vizsgálataink szerint a dohányfüst csökkenti az endotélsejtek nitrogén monoxid termelését, mely hatás glutationnal kivédhető.
- III. A dohányfüst jelentős mennyiségű formaldehidet tartalmaz, amely nagy aktivitással csökkenti a redukált glutation mennyiségét.

A dohányzás hatása az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételére

- IV. Natív poliakrilamid gél elektroforézis vizsgálatokkal igazoltuk endotélsejtek és trombociták fehérjéinek dohányfüstre bekövetkező átstrukturálódását.

A trombociták szabad gyök termelése hiperinzulinémiában

- V. Kemilumineszcencia alkalmazásával kimutattuk, hogy az inzulin növeli a trombociták NO és szuperoxid anion szabad gyök termelését.

Az L-arg nem enzimátikus glikációja

- VI. Vizsgálataink szerint elektron spin rezonancia (ESR) spektroszkópia alkalmazásával igazolható, hogy az L-arg és a glükóz reakcióba lép egymással.
- VII. ESR vizsgálatokkal igazoltuk, az L-arg + glükóz reakció hőmérséklet függését is. E módszer érzéketlensége miatt az L-arg + glükóz reakció testhőmérsékleten nem detektálható.
- VIII. Az L-arg + glükóz reakciót a vas elsősorban redukált, ferro állapota (Fe^{2+}) katalizálja.

Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatása endotélsejtekre

- IX. A KVB-ben szenvedő betegekből származó humán plazma 20%-os oldata 6 órás inkubáció után variábilis hatású HDMVEC NOS aktivitására. A plazma csökkenti a sejtek NOS aktivitását azokban az esetekben, ahol az ADMA koncentráció magas a beteg plazmájában, azonban nem befolyásolja az endotélsejtek L-arg transzportját, eNOS enzim mennyiségét és nem jelentősen befolyásolja a sejtek L-arg koncentrációját. Így az ADMA részben felelős lehet az eNOS aktivitás gátlásáért endotélsejt tenyészetben, de ebben más faktor is szerepet játszik.

Az urea hatása endotélsejtek L-arg transzportjára és NOS aktivitására

- X. Urémiásokból (PD-kezelt betegekből és HD-kezelés előtt) nyert plazma (20%-ban adva szintetikus médiumhoz, 6 órás inkubáció után) gátolja az L-arg transzportot endotélsejt-tenyészetben. A HD kezelés részlegesen megelőzi e gátló hatást.
- XI. Urémiás tartományban észlelhető koncentrációjú urea gátolja az L-arg transzportot HDMVEC sejtekben, 6 órás inkubáció után. Az urea gátló hatása azonban nem kompetitív jellegű, mivel akut hatásban az urea nem befolyásolja az L-arg transzportot.
- XII. Urea 6 órás inkubációs idő alatt még nem, míg 7 nap alatt már gátolja a NOS aktivitást is endotélsejtekben.

Az L-arg - NO útvonal in vivo vizsgálata állatokban - az urea hatása

- XIII. Hét napig tartó nagy mennyiségű diétás urea bevitel nem vezet NO hiányhoz egészséges patkányokban.
- XIV. A magas plazma urea szint nem hat a vesekéreg L-arg koncentrációjára, az eNOS, vagy az nNOS enzim mennyiségére, illetve a vesekéreg és a cerebellum NOS aktivitására sem.
- XV. Hét napig tartó nagy mennyiségű diétás urea bevitel egészséges patkányokban nem okoz jelentős változást az állatok vesehemodinamikájában, nem befolyásolja a vérnyomást és az L-NAME okozta presszor-, illetve vazokonstriktor választ sem.

Humán vizsgálatok - IgA nefropátia és hipertónia

Endotelialis vasoactiv anyagok; a dohányzás szerepe

- XVI. A cGMP és NO_x között észlelt kapcsolat alapján mindkettő mérése alkalmasnak látszik a szervezetben termelődött NO megítélésére.
- XVII. A vizelettel ürített NO_x és a 24 órás vérnyomásmérés átlagai között megfigyelt összefüggés alapján a vérnyomás szabályozásában az NO szerepet játszhat.
- XVIII. A dohányzás kapcsán jelentős mennyiségű NO/NO_x jut a szervezetbe, ezért dohányosoknál a vizelet NO_x alapján nem lehet a szervezet NO termelésére következtetni.

Ambuláns vérnyomásmonitorozás

- XIX. Az ABPM vizsgálat alapján a fehér-köpeny hipertónia előfordulási gyakoriága az IgA nephropátiás betegekben hasonló az átlag populációéval. A non-dipperek illetve fehéreköpeny hipertóniát mutató normotóniás IgA nephropátiás betegek vesefunkciójának romlása gyorsabb.

Terápia

- XX. Hipertónia esetén az IgA nefropátia progressziója a 24 órás vérnyomásmonitorozás eredményeire alapozott gyógykezeléssel illetve hosszabb hatástartamú ACE-gátló illetve Ca-csatorna blokkoló adásával jobban mérsékelhető.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok elsősorban a JÓISTENnek, hogy végig segített utamon, illetve Édesanyámnak, Édesapámnak, Húgomnak és Nagymamáimnak, akik lehetőséget adtak és biztosítottak munkámhoz.

Rendkívüli hálával tartozom két fő tanítómnak: témavezetőmnek Prof. Dr. Nagy Juditnak és amerikai főnökömnek, Prof. Dr. Chris Baylis-nek, hogy mind szakmailag, mind emberileg utat mutattak és támogattak.

A „magyar csapat”-ból elsősorban Dr. Wittmann Istvánnak és Dr. Kovács Tibornak köszönöm segítségét és barátságát minden téren. Továbbá Dr. Schmelczer Matild, Dr. Kocsis Béla, Dr. Melegh Béla, Dr. Csiky Botond, Dr. Wagner Zoltán, Dr. Mazák István, Dr. Vas Tibor, Dr. Szelestei Tamás és Kátai József, Heitmanné Lendvai Anikó, Sámikné Buzás Ilona, Kissné Udvarácz Ildikó, Weber Tünde, Szabó Miklósné Emilia, Bodor Enikő áldozatkész segítsége is elengedhetetlen volt munkámhoz.

Az „amerikai csapat”-ból Dr. Matthew A Boegehold, Dr. James Mahaney, Dr. Jeff M Sands, Dr. William Couser, Dr. Shen Xiao, Dr. John G Hoey, Dr. Rebecca J Schmidt, illetve Lennie J Samsell, Kevin J Engels, Aaron D Erdely, Amy Riggleman, Chris Stalnaker, Marilyn Howton, Gary Freshour keze és feje munkája is benne foglaltatik disszertációmban.

Végül, a dolgozat megszületéséhez segítséget nyújtottak az FKFP 0511/2000 és az ETT T-06396 pályázatok is.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abe K, Abe Y, Saito H: Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res* 2000; 872: 141-148.
2. Abbott RE and Schachter D: Regional differentiation in rat aorta: L-arginine metabolism and cGMP content in vitro. *Am J Physiol* 1994; 266: H2287-H2295.
3. 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.
4. Aiello S, Noris M, Remuzzi G: Nitric oxide synthesis and L-arginine in uremia. *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23: 151-156.
5. Aiello S, Noris M, Remuzzi G: Nitric oxide/L-arginine in uremia. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25: 384-390.
6. Aiello S, Noris M, Todeschini M et al.: Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 1997; 52: 171-181.
7. AlBanchaabouchie M, Marescau B, Possemiers I, D'Hoge R, Levillain O, De Deyn DP: N^G,N^G-dimethylarginine and N^G,N^G-dimethylarginine in renal insufficiency. *Pflügers Arch* 2000; 439: 524-531.
8. Anderstam B, Katzarski K, Bergström J: Serum levels of N^G,N^G-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1437-1442.
9. Andries LJ, Brutsaert DL and Sys SU: Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ. Res.* 1998; 82: 195-203.
10. Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-1206.
11. Archer S: Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7:349-360.
12. Arese M, Strasly M, Ruva C et al.: Regulation of nitric oxide synthesis in uremia. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1386-1397.
13. Arnal JF, 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.
14. Ashab I, Peer G, Blum M et al.: Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production. *Kidney Int* 1995; 47: 1515-1521.
15. 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.
16. Baldwin AL, Thurston G and Al Naemi H: Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1998; 274: H1776-H1784.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A: Shear stress and the endothelium. *Kidney Int* 1998; 54 (S67): S100-S108.
21. Barbul A: Arginine: Biochemistry, physiology and therapeutic implications. *J Parent Enter Nutr* 1986; 10: 227-238.
22. Barri Y et Wilcox CS. Salt intake determines the renal response to L-arginine infusion in normal human subjects. *Kidney Int* 1998; 53: 1299-1304.
23. Baylis C, Bloch J: Nitric oxide in renal physiology and pathophysiology. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1955-1957.
24. Baylis C, Collins RC: Angiotensin II inhibition on blood pressure and renal hemodynamics in pregnant rats. *Am J Physiol* 1986; 250:F308-F314.
25. Baylis C, Engels K, Samsell L, Harton P: Renal effects of acute endothelial -derived relaxing factor blockade are not mediated by angiotensin II. *Am J Physiol* 1993; 264:F74-F78.
26. Baylis C, Harton P, Engels K: Endothelial derived relaxing factor (EDRF) controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 875-881.
27. Baylis C, Mitruka B, Deng A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90: 278-281.
28. Baylis C and Vallance P: Nitric oxide and blood pressure: effects of NO deficiency. *Curr Op Rev* 1996; 5:80-88.

29. Baylis C, Vallance P: Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine-what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system. (editorial review) *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 59-62.
30. Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes *Diabetes*. 1991; 40:405-412.
31. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.
32. Belloni PN, Carney DH and Nicolson GL: Organ-derived microvessel endothelial cells exhibit differential responsiveness to thrombin and other growth factors. *Microvasc Res* 1992; 43: 20-45.
33. Benigni A, Zoja C, Noris M et al.: Renoprotection by nitric oxide donor and lisinopril in the remnant kidney model. *Am J Kidney Diseases* 1999; 33: 746-753.
34. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M et al.: Advanced glycation end product-induced activation of NF- κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997; 46:1481-1490.
35. Birdsey GM, Leiper JM, Vallance P: Intracellular localization of dimethylarginine dimethylamino-hydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 73-79.
36. Blantz RC, Lortie M, Vallon V, Gabbai FB, Parmer RJ, Thomson S: Activities of nitric oxide in normal physiology and uremia. *Semin Nephrol* 1996; 16: 144-150.
37. Blantz RC, Satriano J, Gabbai FB, Kelly C: Biological effects of arginine metabolites. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 21-25.
38. Blum M, Yachnin T, Wollmann Y et al.: Low nitric oxide production in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1998; 79: 265-268.
39. Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S et al.: Elevated L-arginine/ dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Com* 1996; 219:598-603.
40. Boegehold M: Shear-dependent release of venular nitric oxide: effect on arteriolar tone in rat striated muscle. *Am J Physiol* 1996; 271: H387-H395.
41. Boegehold M: Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Curr Opin Nephrol Hypertensi* 1998; 7: 71-78.
42. Boegehold M, Howton M, Wix K: Isolation and Culture of Endothelial Cells from Specific Precapillary Microvessels. in: Twentieth European Conference on Microcirculation, ed.: Carpentier PH, Vicaut E, Guilmot JL, Bologna, Monduzzi Editore, 1998.
43. Boger RH, Sydow K, Borlak J et al.: LDL cholesterol upregulates synthesis of assymetrical dimethylarginine in human endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87: 99-105.
44. Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GSJ, Vallance P: Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases? *Am J Physiol* 1995; 269: C750-C756.
45. Bogle RG., Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S and Mann GE: L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem. J.* 1992; 284: 15-18.
46. Bogle RG, Moncada S, Pearson JD and Mann GE: Identification of selective inhibitors of NO synthase which do not interact with the endothelial cell L-arginine transport. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 768-770.
47. Bohle A, Mackensen HS, von Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz C, Bogenschutz O, Schmitt H, Nagy J, Müller C: The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract* 1990; 186:135-144.
48. Bohlen HG: Determinants of resting and passive intestinal vascular pressures in rat and rabbit. *Am J Physiol* 1987; 253: G587-G595.
49. Bohlen HG: Mechanisms of increased vessel wall nitric oxide concentrations during intestinal absorption. *Am J Physiol* 1998; 275: H542-H550.
50. Bradford MA: Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254 .
51. Bredt DS, Schmidt HHHW: The Citrulline Assay in "Methods of Nitric Oxide Research" Feelisch M, Stamler JS (Eds) John Wiley and Sons, Chichester 1996; 249-255.
52. Bredt DS, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:175-196.
53. Broeders MAW, Tangelder G, Slaaf DW, Reneman RS, Egbrink MGA: Endogenous nitric oxide protects against thromboembolism in venules but not in arterioles. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 139-145.
54. Brusilow SW and Horwich AL: Urea cycle enzymes. in: *The metabolic Basis of Inherited Disease* (6th ed.), edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D; St. Louis, MO; McGraw-Hill, 1989; 629-663.
55. 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.
56. Bucala R, Vlassara H: Advanced glycosylation end products in diabetic renal disease: clinical measurement, pathophysiological significance and prospects for pharmacological inhibition. *Blood Purif* 1995; 13: 160-170.
 57. Buga GM, Singh R, Pervin S et al.: Arginase activity in endothelial cells: inhibition by N^G-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 1996; 271: H1988-H1998.
 58. Castillo L, Ajami A, Branch S et al.: Plasma arginine kinetics in adult man: response to an arginine-free diet. *Metabolism* 1994; 43: 114-122.
 59. Castillo L, Sánchez M, Vogt J et al.: Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1995; 268: E360-E367.
 60. Cattell V, Largen P, De Heer E, Cook T.: Glomeruli synthesize nitrite in active Heyman nephritis; the source is infiltrating macrophages. *Kidney Int* 1991; 40: 847-851.
 61. 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.
 62. Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB: Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 1998; 47: 945-952.
 63. Chappey O, Dosquet C, Wautier M-P, Wautier JL: Advanced glycation end products, oxidative stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:97-108.
 64. Chen L, Salafranca MN, Mehta JH: Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. *Am J Physiol* 1997; 273:H1854-1859.
 65. Chowienczyk P and Ritter J: Arginine: NO more than a simple aminoacid? *Lancet* 1997; 350: 901-902.
 66. Church DF, Pryor WA: Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Envir Health Perspec* 1985; 64:111-126.
 67. Cianciaruso B, Bellizzi V, Minutolo R et al.: Chronic supplementation of L-arginine in patients with moderate renal failure secondary to chronic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 316.
 68. Claris-Appiani A, Ardissimo G, Coppo R et al.: Effect of renal function of arginine supplementation in children with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 766.
 69. Cook HT, Jansen A, Lewis S et al.: Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis; interaction between nitric oxide synthase and arginase. *Am J Physiol* 1994; 267: F646-F653.
 70. Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.
 71. Couet J, Li S, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP: Molecular and cellular biology of caveolae. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 4:103-110.
 72. 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.
 73. Crow JP, Beckman JS: Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Advances in Pharmacology* 1995; 34:17-43.
 74. Daniewska-Michalska D, Motyl T, Gellert L et al.: Efficiency of hemodialysis of pyrimidine compounds in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1993; 64: 193-197.
 75. Davda RK, Chandler LJ, Crews FT and Guzman NJ: Ethanol enhances the endothelial nitric oxide synthase response to agonists. *Hypertension* 1993; 21: 939-943.
 76. Demady DR, Jianmongkol S, Vuletich JL, Bender AT, Osawa Y: Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 24-29.
 77. Devés R, Boyd CAR: Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiological Reviews* 1998; 78: 487-545.
 78. Ding Y, Vaziri ND: Nifedipine and diltiazem but not verapamil up-regulate endothelial nitric oxide synthase expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 606-609.
 79. Divino Filho JC, Barany P, Stehle P, Furst P and Bergstrom J: Free amino acids levels simultaneously collected in plasma, muscle, and erythrocytes of uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2339-2348.
 80. 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.
 81. 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.
 82. 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.
83. Elliott SJ, Koliwad SK: Oxidant stress and endothelial membrane transport. *Free Radical Biol Med* 1995; 19:649-658.
 84. Erdely A, Wagner L, Baylis C: Protection of the Wistar-Furth rat from renal ablation induced chronic renal disease is associated with an elevated nitric oxide system vs. the Sprague-Dawley. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 617A.
 85. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF: Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982; 208:129-140.
 86. 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.
 87. Falcone JC, Bohlen HG: EDRF from rat intestine and skeletal muscle venules causes dilation of arterioles. *Am J Physiol* 1990; 258: H1515-H1523.
 88. Farsang Cs, Alföldy S: *Ambuláns vérnyomásmonitorozás és gyakorlati alkalmazása*. Medintel, Budapest, 1995.
 89. Feehally J: IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura. In: Brady, Wicox (eds): *Therapy in nephrology and hypertension*. Saunders Company 1999; 138-144.
 90. 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.
 91. Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly EA: Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272:17744-17748.
 92. Finlayson JS, Baumann CA: Role of urea in rat proteinuria. *Am J Physiol* 1956; 184: 469-72.
 93. Fleck C, Janz A, Schweitzer F, Karge E, Schwertfeger M, Stein G: Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int* 2001; 59: S14-S18.
 94. Förstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC: Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988; 62:185-190.
 95. Frati AC, Iniestra F, Ariza CR: Acute effect of cigarette smoking on glükóz tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 1996; 19:112-118.
 96. 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.
 97. Fukaya Y, Ohhashi T: Acetylcholine- and flow-induced production and release of nitric oxide in arterial and venous endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 270: H99-H106.
 98. Furusu A, Miyazaki M, Abe K et al.: Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53: 1760-1768.
 99. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ: Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 1996; 316: 247-249.
 100. Gansevoort RT, Sluiter WJ, Hemmelder MH, de Zeeuw D, de Jong PE: Antiproteinuric effect of blood-pressure-lowering agents: a meta-analysis of comparative trials. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:1963-1974.
 101. Garlanda C and Dejana E: Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1193-1202.
 102. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RMJ, de Groot PG, and Sixma JJ: Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992; 85: 2284-2290.
 103. Gazzola GC, Dall'Asta V, Franchi-Gazzola R, White MF: The cluster tray method for rapid measurement of solute fluxes in adherent cultured cells. *Anal Biochem* 1981; 115:368-374.
 104. Geiger M, Stone A, Mason S, Oldham KT and Guice KS: Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 273: L275-L281.
 105. Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G et al.: The vascular effects of L-arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest* 1997; 99: 433-438.
 106. 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.
 107. Goligorsky MS: Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Int* 2000; 58: 1360-1376.
 108. Gross SS: Targeted delivery of nitric oxide. *Nature* 2001; 409: 577-578.
 109. Gross SS, Lane P: Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: A radical rethink. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9967-9969.
 110. Guerin MR: Chemical composition of cigarette smoke. in: Gori GB and Bock FG (eds.): *Banbury Report. A safe cigarette?* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980; 191-204.

111. Gutteridge JM: Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett* 1981; 128:343-346.
112. Halaris A, Zhu H, Feng Y, Piletz JE. Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann NY Acad Sci USA* 1999; 881: 445-451.
113. Hand MF, Haynes WG, Webb DJ. Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int* 1998; 53: 1068-1077.
114. Harrison, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100: 2153-2157.
115. 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.
116. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Ånggård 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.
117. Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B: Ca^{2+} /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281:627-630.
118. Henry Y, Lepoivre M, Drapier J-L, Ducrocq C, Buoche J-L, Guissani A: EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993;7:1124-1134.
119. Hertz P, Richardson, A. Arginine-induced hyperkalemia in renal failure patients. *Arch Intern Med* 1972; 130: 778-780.
120. Higashi Y, Oshima T, Watanabe M, Matsuura H, Kajiyama G. Renal response to L-arginine in salt-sensitive patients with essential hypertension. *Hypertension* 1996; 27: 643-648.
121. Himmel HM, Whorton AR and Strauss HC: Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 1993; 21: 112-127.
122. Himmelfarb J: Urea: Surrogate or toxin? *Kidney Int* 1999; 56: 754-755.
123. 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.
124. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377:239-242.
125. Hunley TE, Iwasaki S, Homma T, Kon V: Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings. *Pediatr Nephrol* 1995; 9:235-244.
126. Ienaga K, Nakamura K, Hoshi T et al.: Crosslinks. Fluorophores in the AGE-related proteins. *Contrib Nephrol* 1995; 112:42-51.
127. 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.
128. Ikegaya N, Yamamoto T, Peters H, Pollock J, Border WA, Noble NA: Increased expression of endothelial nitric oxide synthase, TGF- β 1 and matrix proteins in human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:1563.
129. Ingram A, Parbtani A, Thai K et al. Dietary supplementation with L-arginine limits cell proliferation in the remnant glomerulus. *Kidney Int* 1995; 48: 1857-1865.
130. Ishizuka S, Cunard R, Poucell-Hatton S et al.: Agmatine inhibits cell proliferation and improves renal function in anti-thy-1 glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2256-2264.
131. 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.
132. Jansen A, Cook T, Taylor GM et al: Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int* 1994; 45:1215-1219.
133. Jansen A, Lewis S, Cattell V, Cook HT: Arginase is a major pathway of L-arginine metabolism in nephritic glomeruli. *Kidney Int* 1992; 42: 1107-1112.
134. Jones AF, Lunec J: Protein fluorescence and its relationship to free radical activity. *Br J Cancer* 1987; 55(Suppl. VIII):60-65.
135. Kakimoto Y, Akazawa S: Isolation and identification of N^G, N^G - and N^G, N^G -dimethyl-arginine, N^1 -mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970; 245: 5751-5758.
136. Kalogeris TJ, Kevil CG, Laroux FS, Coe LL, Phifer TJ and Alexander JS: Differential monocyte adhesion and adhesion molecule expression in venous and arterial endothelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276: L9-L19.
137. Kanno K, Hirata Y, Emori T, Ohta K, Eguchi S, Imai T, Marumo F: L-arginine infusion induce hypotension and diuresis/natriuresis with concomitant increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMP in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19:619-625.
138. Kashem A, Endoh M, Yano N, Yamauchi F, Nomoto Y, Sakai H: Expression of inducible-NOS in

- human glomerulonephritis: The possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney Int* 1996; 50: 392-399.
139. Kato T, Takahashi K, Klahr S, Reyes AA, Bard KF: Dietary supplementation with L-arginine ameliorates glomerular hypertension in rats with subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: 1690-1694.
 140. Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL: Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38:4343-4362.
 141. Ketteler M, Border WA, Noble NA: Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol* 1994; 267: F197-F207.
 142. Ketteler M, Ikegaya N, Brees DK, Border WA, Noble NA: L-arginine metabolism in immune-mediated glomerulonephritis in the rat. *Am J Kidney Diseases* 1996; 28: 878-887.
 143. Ketteler M, Ritz E: Renal failure: A state of nitric oxide deficiency? *Kidney Int* 2000; 58: 1356-1357.
 144. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Frölich JC, Haller H, Böger RH: Relationship of asymmetric dimethylarginine to dialysis treatment and atherosclerotic disease. *Kidney Int* 2001; 59: S9-S13.
 145. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM et al.: Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 594-600.
 146. Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M: Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H₂O₂ system. *Anal Chem* 1993; 65:1794-1799.
 147. Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K: Detection of N^G, N^G-Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem and Biophys* 1993; 300: 657-662.
 148. Kimoto M, Whitley GSJ, Tsuji H, Ogawa T: Detection of N^G,N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem* 1995; 117: 237-238.
 149. Kishimoto I, Garbers DL: Physiological regulation of blood pressure and kidney function by guanylyl cyclase isoforms. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6:58-63.
 150. Klahr S: Can L-arginine manipulation reduce renal disease? *Semin Nephrol* 1999; 19: 304-309.
 151. Klahr S, Levey AS, Beck GJ et al.: The effects of dietary restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease: Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Engl J Med* 1994; 330: 877-884.
 152. Klahr S et Morrissey J: Renal disease: The two faces of nitric oxide. *Lab Invest* 1995; 72: 1-3.
 153. Kone BC: Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 311-333.
 154. Kone BC, Baylis C: Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997; 272: F561-F578.
 155. 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.
 156. Koschinsky T, He CJ, 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.
 157. Kovács T, Barta J, Kocsis B, Nagy J: Nitric oxide in IgA nephropathy patients with or without hypertension. *Exp Nephrol* 1995; 3: 369-372.
 158. Kubes P, Suzuki M and Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.
 159. Kuhlmann MK, Kopple JD. Amino acid metabolism in the kidney. *Semin Nephrol* 1990; 10: 445-457.
 160. Kuo L, Arko F, Chilian WM, Davis MJ: Coronary venular responses to flow and pressure. *Circ Res* 1993; 72: 607-615.
 161. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ: Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol* 1991; 261: H1706-H1715.
 162. Kurz S, Harrison DG: Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest* 1997; 99: 369-370.
 163. Laidlaw SA, Berg RL, Kopple JD et al.: (The Modification of Diet in Renal Disease Group) Patterns of fasting plasma amino acid levels in chronic renal insufficiency: Results from the feasibility phase of the modification of diet in renal disease study. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 504-513.
 164. Lane P, Gross SS: Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 1999; 19: 215-229.
 165. Lange R: Inhibiting effect of tobacco smoke on some crystalline enzymes. *Science* 1961; 134:52-54.
 166. Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR, Simmons RL: Nitric oxide- A new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993; 55:1205-1212.
 167. Lau T, Owen W, Yu YM et al.: Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest* 2000; 105: 1217-1225.
 168. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A et al.: Identification of two human dimethylarginine dimethylamino-hydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine

- deiminases. *Biochem J* 1999; 343: 209-214.
169. Leiper JM, Vallance P: Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 542-548.
 170. 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.
 171. Levey AS, Adler S, Caggiula AW et al.: Effects of dietary protein restriction on the progression of advanced renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 652-663.
 172. Levillain O, Hus-Citharel A, Morel F, Bankir L: Localization of arginine synthesis along the rat nephron. *Am J Physiol* 1990; 259: F916-923.
 173. Liggins J, Furth AJ: Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1361:123-130.
 174. Lim J, Gasson C and Kaji DM: Urea inhibits NaK₂Cl cotransport in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2126-2132.
 175. Lin KF, Chao L, Chao J: Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension* 1997; 30:307-13.
 176. Lincoln TM, Cornwell TL: Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993; 7:328-338.
 177. Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA, Cornwell TL: cGMP signalling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv Pharmacol* 1995; 34:305-322.
 178. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC: Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: Implications for caveolae localization. *Biochemistry* 1996; 35: 13277-13281.
 179. Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW et al.: Agmatine, a bioactive metabolite of arginine: production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 413-420.
 180. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120:227-237.
 181. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
 182. Lüscher TF, Boulanger CM, Yang Z, Noll G and Dohi Y: Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and cardiovascular disease. *Circulation* 1993; 87 (SV): V-36 - V-44.
 183. Lyons JT, Jenkins AJ: Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipid* 1997; 8:174-180.
 184. 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.
 185. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M et al: Regulation of Nitric Oxide Synthesis by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *British J Pharm* 1996; 119: 1533-1540.
 186. MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E: Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 2449-2452.
 187. Mailloux LU, Levey S: Hypertension in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1998; 5(S3): S120-S141.
 188. Marescau BG, Nagels G, Possemiers I, De Broe ME, Becaus I, Billiow JM, Lornoy W, De Deyn PP: Guanidino compounds in serum and urine of nondialysed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism* 1997; 46: 1024-1031.
 189. Matsushita Y, Yokoyama K, Tagami T et al.: Effect of arginine administration in patients with total parenteral nutrition and chronic renal failure. *Nephron* 1999; 83: 165-166.
 190. Mattson DL and Bellehumeur TG: Neural nitric oxide synthase in the renal medulla and blood pressure regulation. *Hypertension* 1996; 28: 297-303.
 191. Mayer B: Nitric oxide synthases catalyze superoxide formation. *FEBS Letters* 2000; 481: 304-307.
 192. Mazák I, Wittmann I, Póto L et al.: Role of iron and methylglyoxal in diabetic nephropathy. In vitro study using red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: A74.
 193. McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS: A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997; 272: 31213-31216.
 194. McGuire DM, Gross MD, Elde RP, Van Pilsum JF: Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 429-435.
 195. 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.
196. Mendes-Ribeiro AC, Brunini TMC, Yaqoob M, Aronson JK, Mann GE, Ellory JC: Identification of system y⁺L as the high affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. *Pflugers Arch. – Eur J Physiol* 1999; 438: 573-575.
 197. Mendes-Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC: Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin Sci* 1997; 93: 57-64.
 198. Michel T, Feron O: Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100:2146-2152.
 199. Mitch WE, Walker M: A simple method of estimating progression of chronic renal failure. *Lancet* 1976; 2:1326-1328.
 200. Moeslinger T, Friedl R, Volf I, Brunner M, Baran H, Koller E, Spieckermann PG: Urea induces macrophage proliferation by inhibition of inducible nitric oxide synthesis. *Kidney Int* 1999; 56:581-588.
 201. Moncada S, Higgs A: The L-arginine – nitric-oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
 202. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
 203. Mori M, Gotoh T: Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 275: 715-719.
 204. Morris SM: Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 81-101.
 205. Morrissey JJ, Klahr S: Agmatine activation of nitric oxide synthase in endothelial cells. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109: 51-57.
 206. Mullins LJ: Ion transport in heart. Raven Press, New York, 1981
 207. Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, Niwa T, Lemke HD, 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.
 208. Nagy J, DeMaster E, Wittmann I, Schultz P, Raji L: Induction of Endothelial Cell Injury by Cigarette Smoke. *Endothelium* 1997; 5: 251-263.
 209. 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.
 210. 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 glükóz. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232:227-230.
 211. Nakayama M, Nakano H, Yamada K et al.: Depressor effect of L-arginine in normotensive patients on regular dialysis treatment. *Clin Nephrol* 1996; 46: 286.
 212. Narita I, Border WA, Ketteler M, Noble NA: Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. *Laboratory Investigation* 1995; 72: 17-24.
 213. Narita I, Border WA, Ketteler M, Ruoslahti E, Noble NA: L-arginine may mediate the therapeutic effects of low protein diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4552-4556.
 214. Nash T: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction *Biochem* 1953; 55:416-421.
 215. Nichols K, Staines W, Rubin S and Krantis A: Distribution of nitric oxide synthase activity in arterioles and venules of rat and human intestine. *Am J Physiol* 1994; 267: G270-G275.
 216. De Nicola L, Bellizzi V, Minutolo R: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of arginine supplementation in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 56: 674-684.
 217. De Nicola L, Minutolo R, Bellizzi V, Andreucci M, La Verde A, Cianciaruso B: Enhancement of nitric oxide synthesis by L-arginine supplementation in renal disease: Is it good or bad? *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23: 144-150.
 218. Noris M, Benigni A, Boccardo P et al.: Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: Implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993; 44: 445-450.
 219. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K: Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethyl-aminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem* 1989; 264: 10205-10209.
 220. Ohyanagi M, Nishigaki K, Faber JE: Interaction between microvascular α_1 - and α_2 -adrenoceptors and endothelium derived relaxing factor. *Circ Res* 1992; 71: 188-200.
 221. D'Orleans-Juste P, Mitchell JA, Wood EG, Hecker M and Vane JR: Comparison of the release of vasoactive factors from venous and arterial bovine cultured endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; 70: 687-694.
 222. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE: Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323:22-27.
 223. Parker JC: Urea alters set point volume for K-Cl cotransport, Na⁺-H exchange and Ca-Na⁺ exchange

- in dog red blood cells. *Am J Physiol* 1993; 265:C447-C452.
- 224.Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS: Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 2001; 409: 622-626.
- 225.Peters H, Border WA, Noble NA: L-arginine supplementation increases mesangial cell injury and subsequent tissue fibrosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 55: 2264-2273.
- 226.Peters H, Border WA, Noble NA: From rats to man: a perspective on dietary L-arginine supplementation in human renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1640-1650.
- 227.Peters H, Border WA, Noble NA: Tandem antifibrotic actions of L-arginine supplementation and low protein diet during the repair phase of experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000; 57: 992-1001.
- 228.Peters H, Noble NA: Dietary L-arginine in renal disease. *Semin Nephrol* 1996; 16: 567-575.
- 229.Peterson GL: Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220.
- 230.Pettersson A, Uggla L, Bachman V: Determination of dimethylated arginines in human plasma by high pressure liquid chromatography. *J Chromat B* 1997; 692:257-262.
- 231.Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Ferid, M: 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.
- 232.Prabhakar SS, Zeballos GA, Montoya-Zavala M and Leonard C: Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *Am J Physiol* 1997; 273: C1882-1888.
- 233.Preik-Steinhoff H, Zink S, Rosen P and Kelm M: Transport of L-arginine in arginine deprived endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 213:447-453.
- 234.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.
- 235.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.
- 236.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.
- 237.Puntarulo S, Cederbaum AI: Inhibition of ferritin-stimulated microsomal production of reactive oxygen intermediates by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 340:19-26.
- 238.Qiu C, Engels K, Baylis C: Endothelin modulates the pressor actions of acute systemic nitric oxide blockade. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1476-1481.
- 239.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
- 240.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.
- 241.Raij L: Nitric oxide and the kidney. *Circulation* 1993; 87: V26-V29.
- 242.Raij L, Baylis C: Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995; 48: 20-32.
- 243.Rajagopalan KV, Fridovich I and Handler P: Competitive inhibition of enzymic activity by urea. *J Biol Chem* 1963; 236: 1059-1065.
- 244.Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ et al.: Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life Sciences* 1994; 55: 1895-1902.
- 245.Reckelhoff JF, Kellum JA, Racusen LC, Hildebrandt DA: Long-term dietary supplementation with L-arginine prevents age-related reduction in renal function. *Am J Physiol* 1997; 272: R1768-R1774.
- 246.Regunathan S, Youngson C, Raasch W, Wang H, Reis DJ: Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1996; 276: 1272-1282.
- 247.Reyes AA, Karl I, Kissane J, Klahr S: L-arginine administration prevents glomerular hyperfiltration and decreases proteinuria in diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 1039-1045.
- 248.Reyes AA, Karl I, Klahr S: Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol* 1994; 267: F331-F346.
- 249.Reyes AA, Karl I, Yates J, Klahr S: Low plasma and renal tissue levels of L-arginine in rats with obstructive nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45: 782-787.
- 250.Reyes AA, Klahr S: Dietary supplementation of L-arginine ameliorates renal hypertrophy in rats fed a high-protein diet. *PSEBM* 1994; 206: 157-161.
- 251.Reyes AA, Purkerson ML, Karl I, Klahr S: Dietary supplementation with L-arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Am J Kidney Diseases* 1992; 20: 168-176.
- 252.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.
253. Richards MK, Marletta MA: Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry* 1994; 33: 14723-14732.
 254. Risau W: Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995; 9: 926-933.
 255. Rooney LW, Salem A, Johnson JA: Studies of the carbonyl compounds produced by sugar-amino acid reactions. I Model systems 1967; 44:539-550.
 256. Saijonmaa O, Metsarinne K, Fyhrquist F: Carvedilol and its metabolites suppress endothelin-1 production in human endothelial cell culture. *Blood Press* 1997; 6: 24-28.
 257. Sase K, Michel T: Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7:25-34.
 258. Sato J, Masuda H, Tamaoki S et al.: Endogenous Asymmetrical Dimethylarginine and hypertension Associated with Puromycin Nephrosis in the Rat. *British J Pharm* 1998; 125: 469-476.
 259. Satriano J, Kelly CJ, Blantz RC: An emerging role for agmatine. *Kidney Int* 1999; 25: 1252-1253.
 260. Schachter D and Sang JC: Regional differentiation in the rat aorta: effects of cyclooxygenase inhibitors. *Am J Physiol* 1997; 273: H1478-H1483.
 261. Schena FP: IgA nephropathies in Davison, Cameron, Grünfeld, Kerr, Ritz, Winearls (eds): *Textbook of Nephrology* Oxford University Press 1997; 537-570.
 262. Schena FR, Montenegro M, Scivittaro V: Meta-analysis of randomised controlled trials in patients with primary IgA nephropathy (Berger's disease). *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5(suppl 1):47-52.
 263. Schmidt RJ, Baylis C: Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2000; 25: 1261-1266.
 264. Schmidt RJ, Domico J, Samsell LS, Yokota S, Tracy TS, Sorkin MI, Engels K, Baylis C: Indices of activity of the nitric oxide system in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 228-234.
 265. Schmidt RJ, Yokota S, Tracy TS, Sorkin MI, Baylis C: Nitric oxide production is low in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Am J Physiol* 1999; 276: F794-F797.
 266. 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, Schattauer, Stuttgart, New York, 1997; 77-95.
 267. Schwartz JG: The role of glycohaemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Rev* 1995; 3:269-287.
 268. Sessa WC, Hecker M, Mitchell JA, Vane JR: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8607-8611.
 269. Sever R, Cook T, Catell V: Urinary excretion of nitrite and nitrate in experimental glomerulonephritis reflects systemic immune activation and not glomerular synthesis. *Clin Exp Immunol* 1992; 90:326-329.
 270. 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.
 271. Siani A, Pagano E, Iacone R, Iacoviello L, Scopacasa F, Strazzullo P: Blood pressure and metabolic changes during dietary L-arginine supplementation in humans. *AJH* 2000; 13: 547-551.
 272. Sladek SM, Roberts JM: Nitric oxide synthase activity in the gravid rat uterus decreases a day before the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1661-1667.
 273. Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K: NOS gene polymorphism and its influence on cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1999; 8:83-87.
 274. Song J and Ram JL: Ionic mechanisms of peptide-induced responses in vascular endothelial cells. In: *Contemporary Endocrinology: Endocrinology of the Vasculature*. Edited by Sowers JR, Totowa NJ: Humana Press; 1996; 21-36.
 275. 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.
 276. Stamler JS: Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78:931-936.
 277. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J et al.: Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7674-7677.
 278. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiß U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M: NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; 410: 212-215.
 279. 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.

280. Su Y, Couch M, Block ER: Substrate inhibition of nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells in culture. *Nitric oxide: Biology and Chemistry* 1997; 1: 469-475.
281. Sun IL, Crane FL, Löw H, Grebing C: Transplasma membrane redox stimulates HeLa cell growth. *Biochim Biophys Res Comm* 1984; 125:649-654.
282. Sütő T, Losonczy G, Qiu C, Hill C, Samsell L, Ruby J, Charon N, Venuto R, Baylis C: Acute Changes in Urinary Excretion of Nitrite+Nitrate (U_{NOX}) do not Predict Renal Vascular NO Production. *Kidney Int.* 1995; 48: 1272-1277.
283. Sweeney C, Schultz P, Raij L: Autocrine stimulation of endothelial cell cGMP by endothelium derived relaxing factor, nitric oxide: differential effects of endothelial cell injury by two oxidants. *Clin Res* 1991; 39: 147A.
284. Timio M, Venanzi S, Lolli S, Lippi G, Verdura C, Monarca C, Guerrini E: "Non-dipper" hypertensive patients and progressive renal insufficiency: a 3-year longitudinal study. *Clin Nephrol* 1995; 43:382-387.
285. Tizianello A, De Ferrari G, Garibotto G, Gurrei G, Robaudo C: Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *J Clin Invest* 1980; 65: 1162-1173.
286. Tojo A, Welch WJ, Bremer V et al.: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997; 52: 1593-1601.
287. Tomera JF: Nitric oxide: the interrelation of its actions. *Drugs of Today* 1994; 30:611-621.
288. 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.
289. 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.
290. Tsuchiya K, Takasugi M, Minakuchi K, Fukuzawa K: Sensitive quantitation of nitric oxide by EPR spectroscopy. *Free Radical Biol Med* 1996; 21:733-737.
291. Tsuji S: Chicken ornithine transcarbamoylase: purification and some properties. *J Biochem (Tokyo)* 1983; 94: 1307-1315.
292. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T et al.: Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 245: 190-193.
293. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
294. Vaziri ND, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ: Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: Role of excess PTH. *Am J Physiol* 1998; 274: F642-F649.
295. Vaziri ND, Ovelisi F, Ding Y: Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int* 1998; 53: 1748-1754.
296. 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.
297. Vlassara H: Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complication. *Diabetes* 1997; 46(Suppl II):S19-S25.
298. Wagner L, Riggleman A, Erdely A, Couser W, Baylis C: Reduced total nitric oxide production and renal endothelial NO synthase abundance and NOS activity in rats with chronic renal disease secondary to glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 632A.
299. Wagner L, Sands JM, Baylis C: Cultured endothelial cells express functional urea transporters which influence membrane L-arginine transport. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 48 A.
300. Wagner Z, Wittmann I, Pótó L, Wagner L, Belágyi J, Nagy J: Az arginin glikációjának szabad gyökös mechanizmusa. *Hypertonia és Nephrologia* 1999; 3: 194-198.
301. Wald C, Czaczkes W, Dikstein S: Effect of ethacrynic acid on the glutathione activated ATP-ases. *Naturwissenschaften* 1972; 59:1-2.
302. deWeerd WFC, Leeb-Lundberg LMF: Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G α subunits G α_q and G α_i in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272:17858-17866.
303. 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.
304. 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.
305. 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.

306. 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.
307. Wever R, Boer P, Hijmering M et al.: Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1168-1172.
308. Wiemer G, Fink E, Linz W et al.: Furosemide enhances the release of endothelial kinins, nitric oxide and prostacyclin. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271(3): 161-165.
309. Wittmann I, Mazák I, Póto L, Wagner Z, Wagner L, Vas T, Kovács T, Belágyi J, Nagy J: Role of iron in the interaction of red blood cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling. *Chem Biol Interact* 2001; 138:171-187.
310. 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.
311. Wolf SC, Erley CM, Kenner S, Berger ED, Risler T: Does L-arginine alter proteinuria and renal hemodynamics in patients with chronic glomerulonephritis and hypertension? *Clin Nephrol* 1995; 43 (Suppl I): S42-46.
312. Wu G, Meininger CJ: Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by glutamine in endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 265: H1965-H1971.
313. Wu G, Meininger CJ: Impaired arginine metabolism and NO synthesis in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol*. 1995; 269: H1312-H1318.
314. Wu G, Morris SM, Jr: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336: 1-17.
315. 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.
316. Xia Y, Zweier JL: Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12705-12710.
317. Xiao S, Erdely A, Wagner L, Baylis C: Uremic levels of BUN do not cause nitric oxide deficiency in rats with normal renal function. *Am J Physiol* 2001; 280: F996-F1000.
318. Xiao S, Schmidt RJ, Baylis C: Plasma from ESRD patients inhibits nitric oxide synthase activity in cultured human and bovine endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 175-179.
319. Xiao S, Wagner L, Mahaney J, Baylis C: Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 2001; 280: F989-995.
320. Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C: Circulating eNOS inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney International Kidney Int* 2001; 59(4):1466-72.
321. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, Nucci G De, Zatz R: Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension* 1996; 27: 1165-1172.
322. Yokoyama K, Tsukada T, Matsuoka H et al.: High accumulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS): A gene polymorphism in patients with end-stage renal disease. *Nephron* 1998; 79:360-361.
323. Yu BP: Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radical Biol Med* 1996; 21:651-668.
324. 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.
325. Zatz R, Baylis C: Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-964.
326. Zhang X, Recchia FA, Bernstein R et al.: Kinin-mediated coronary nitric oxide production contributes to the therapeutic action of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitors and amlodipine in the treatment in heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288(2): 742-751.
327. Zink P, Rosen P, Sackmann B, Lemoine H: Regulation of endothelial permeability by beta-adrenoceptor agonists: contribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178: 286-298.
328. 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.

10. A SZERZŐ ÉRTEKEZÉSEL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓI

Közlemények

Angol nyelvű

- 1.** Botond Csiky, Tibor Kovács, **László Wagner**, Tibor Vas, Judit Nagy: Ambulatory blood pressure monitoring and progression in patients with IgA nephropathy
Nephrol Dial Transplant 1999; 14: 86-90.
- 2.** Tibor Kovács, Tibor Vas, **László Wagner**, Matild Schmelczer, Béla Kocsis, Judit Nagy: Effect of smoking on urinary NOx and cGMP excretion in IgA nephropathy and in health
Contrib Nephrol 2000; 130:124-129.
- 3.** Shen Xiao, **László Wagner**, Rebecca J Schmidt, Chris Baylis: Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease
Kidney Int 2001; 59(4): 1466-72.
- 4.** Shen Xiao, **László Wagner**, James Mahaney, Chris Baylis: Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells
Am J Physiol 2001; 280: F989-F995.
- 5.** Shen Xiao, Aaron Erdely, **László Wagner**, Chris Baylis: Uremic levels of BUN do not cause nitric oxide deficiency in rats with normal renal function
Am J Physiol 2001; 280: F996-F1000.
- 6.** **László Wagner**, John G. Hoey, Aaron Erdely, Matthew A Boegehold, Chris Baylis: The nitric oxide pathway is amplified in venular vs arteriolar cultured rat mesenteric endothelial cells
Microvasc Res 2001; 62: 401-409.
- 7.** István Wittmann, Tamás Kószegi, **László Wagner**, Zoltán Wagner, István Mazák, Judit Nagy: Insulin-induced peroxynitrite production in human platelet-rich plasma
Redox Report 2001; 6: 251-255.
- 8.** István Wittmann, István Mazák, László Pótó, Zoltán Wagner, **László Wagner**, Tibor Vas, Tibor Kovács, József Belágyi, Judit Nagy: Role of iron in the interaction of red blood cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling
Chem Biol Interact 2001; 138: 171-187.

Magyar nyelvű

- 9.** Kovács Tibor, **Wagner László**, Vas Tibor, Schmelczer Matild, Kocsis Béla, Nagy Judit: A nitrogén-monoxid, endothelin és a vérnyomás kapcsolata IgA nephropathias betegekben
Magy Belorv Arch, 1998; 51(1): 9-16.
- 10.** Nagy Judit, Wittmann István, **Wagner László**, Eugene G. DeMaster, Pamela Schultz, Leopoldo Raij: A cigarettafüstben levő szabadgyökök okozta endotélsejt károsodás
Magy Belorv Arch, 1998; 51(1): 43-49.
- 11.** Wittmann István, **Wagner László**, Kátai József, Kassai Gábor, Mazák István, Nagy Judit: Az inzulin gátló hatása trombociták ATP szekréciójára
Magy Belorv Arch, 1998; 51(1): 61-65.
- 12.** Wagner Zoltán, Wittmann István, Pótó László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Glükóz szabad gyök képződése hidroxil szabad gyök jelenlétében
Diabetologia Hungarica 1998; 4: 205-211.
- 13.** Wagner Zoltán, Wittmann István, Pótó László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Az arginin glikációjának szabad gyökös mechanizmusa
Hypertonia és Nephrologia, 1999; 3: 194-198.
- 14.** Wittmann István, Wagner Zoltán, **Wagner László**, Mazák István, Nagy Judit: A nem-enzimatisz glikáció szerepe az öregedés, az ateroszklerózis és a diabeteses nephropathia pathophysiológiájában és klinikai képének kialakulásában (felkért összefoglaló)
Diabetologia Hungarica, 1999; 7: 9-21.
- 15.** *Wagner László, Wittmann István, Kovács Tibor, Wagner Zoltán, Mazák István, Vas Tibor, Csiky Botond, Molnár Gergő, Nagy Judit: Az L-arginin anyagcsere lehetséges útvonalai
Hypertonia és Nephrologia, közlésre elfogadva (2002)*
- 16.** *Wagner László, Wittmann István, Kovács Tibor, Wagner Zoltán, Mazák István, Vas Tibor, Csiky Botond, Molnár Gergő, Nagy Judit: Az L-arginin adásának és megszorításának hatása egészséges és beteg vesére
Hypertonia és Nephrologia, közlésre elfogadva (2002)*

17. Wagner László, Hoey John G, Erdely Aaron, Boegehold Matthew A, Baylis Chris: *A nitrogén monoxid rendszer fokozottabb patkány mezentériumából származó venuláris endothelsejt tenyészetben, mint az arterioláris oldalon*
Hypertonia és Nephrologia, közlésre benyújtva (2002)

Kongresszusi összefoglalók, absztrakt publikációk

Angol nyelvű

18. László Wagner, Tibor Kovács, Béla Kocsis, Matild Schmelzer, Judit Nagy: Relationship between ambulatory blood pressure monitoring and vasoactive mediators in IgA nephropathy
Nephrol Dial Transplant 1996; 11: A99.

19. Tibor Kovács, Tibor Vas, László Wagner, Judit Nagy: Ambulatory blood pressure monitoring: new possibility of the diagnosis and care of hypertension in patients with IgA nephropathy
Przegląd Lekarski 1996; 53(S2): 104.

20. László Wagner, István Wittmann, Tamás Koszegi, József Kátai, Judit Nagy: The possible role of hyperinzulinemia in the development of diabetic nephropathy
Nephrology 1997; 3(S1): S259.

21. Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, Judit Nagy: Slowing down of the progression of IgA nephropathy after ambulatory blood pressure monitoring-guided blood pressure treatment
Nephrology 1997; 3(S1): S355.

22. István Wittmann, Tamás Kőszegi, József Kátai, László Wagner, Márta Molnár, Judit Nagy: Insulin-induced nitric oxide and superoxide free radical production of human platelets
Diabetologia 1997; 40(S1): A144.

23. Judit Nagy, László Wagner, Tibor Vas, Tamás Szelestei, Tibor Kovács: Comparison of short- and long-acting angiotensin converting enzyme inhibitors and calcium channel blockers on the progression of IgA nephropathy
J Am Soc Nephrol 1997; 8: 319A.

24. Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, Tamás Szelestei, Judit Nagy: The connection between antihypertensive therapy and progression of IgA nephropathy

Am J Kidney Dis 1998; 31(3): A23.

25. László Wagner, István Wittmann, József Kátai, Béla Melegh, Judit Nagy: The effect of cigarette smoke on the protein components of endothelial cells
Nephrol Dial Transplant 1998; 13(6): A52.

26. József Kátai, István Wittmann, **László Wagner**, Béla Melegh, Judit Nagy: Protein degradation in platelets caused by cigarette smoke
Nephrol Dial Transplant 1998; 13(6): A52.

27. László Wagner, István Wittmann, József Kátai, Béla Melegh, Judit Nagy: Does cigarette smoke affect the protein components of endothelial cells?
Aktuality v nefrologii 1998; 4(1): 54.

28. István Mazák, István Wittmann, **László Wagner**, Zoltán Wagner, Judit Nagy: Smoke inhibits bradykinin-induced calcium influx in endothelial cells
Nephrol Dial Transplant 1999; 14: A10.

29. László Wagner, Chris Baylis, Matthew A. Boegehold: Arteriolar-venular differences in the nitric oxide pathway in cultured rat mesenteric endothelial cells
FASEB Journal 2000; 14: A117.

30. László Wagner, Jeff M Sands, Chris Baylis: Cultured endothelial cells express urea transporters which influence membrane L-arginine transport
J Am Soc Nephrol 2000; 11: 48A.

31. István Mazák, István Wittmann, László Pótó, Zoltán Wagner, Tibor Kovács, **László Wagner**, Tibor Vas, József Belágyi, Judit Nagy: Role of iron and methylglyoxal in diabetic nephropathy. In vitro study using red blood cells.
Nephrol Dial Transplant 2001; 16: A74.

Magyar nyelvű

32. Wagner László, Kovács Tibor, Kocsis Béla, Schmelzer Matild, Nagy Judit: A vérnyomás és a vasoactív mediátorok összefüggése IgA nephropathiában
Magy Belorv Arch 1996; 49(S1): 48.

33. Kovács Tibor, Vas Tibor, Szelestei Tamás, Csiky Botond, **Wagner László**: Rövid- és hosszúhatású ACE gátlók és Ca-csatorna blokkolók renoprotektív hatásának

összehasonlítása IgA nephropathias betegekben
Hypertonia és Nephrologia 1997; 1(S2): 37.

34. Wittmann István, Kőszegi Tamás, Kovács Brigitta, Kátai József, **Wagner László**, Nagy Judit: Az inzulin nitrogén-monoxid és szuperoxid szabadgyök-termelést indukál humán trombocitákban

Diabetologia Hungarica 1998, VI. évf. I. Suppl., 75.

35. Wagner László, Kátai József, Wittmann István, Melegh Béla, Nagy Judit: A dohányfüst megváltoztatja az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételét

Hypertonia és Nephrologia 1998; S2(3): 67.

36. Wagner Zoltán, Wittmann István, Pótó László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Glükóz szabad gyök képződése hidroxil gyök jelenlétében Hypertonia és Nephrologia 1998; S2(3): 69.

37. Kovács Tibor, **Wagner László**, Vas Tibor, Schmelczer Matild, Kocsis Béla, Nagy Judit: Vizelet cGMP és NOx ürítés összehasonlítása IgA nephropathiás betegekben

Hypertonia és Nephrologia 1998; S2 (3): 72.

Addendum

Dr. Wagner László: Az L-arginin - nitrogén monoxid rendszer szerepe a vesebetegségek progressziójában

című doktori (PhD) - értekezéséhez

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

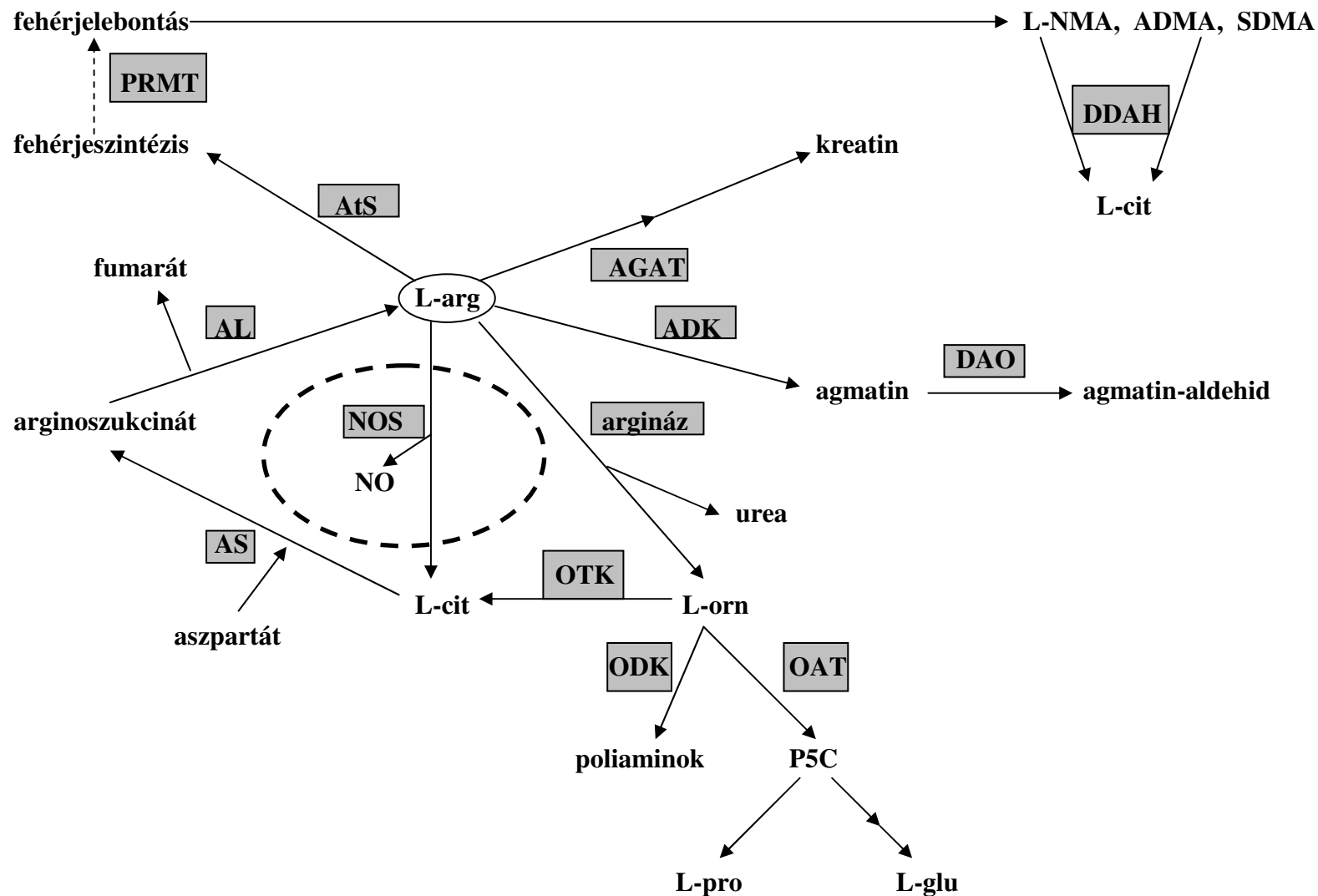
ÁBRÁK

1. Az L-arginin metabolizmusa.
2. Az L-arginin-NO rendszer.
3. Az NO befolyásoló hatása a vese hemodinamikára.
4. Arterioláris endotélsejtek (RMAEC) izolálása patkány mezentériumból.
5. Patkány mezentériumból izolált endotélsejtek natív fáziskontraszt mikroszkópos képe.
6. Patkány mezentériumból izolált endotélsejtek, oxidált LDL-felvétel (fluorescens rodamin festés).
7. Patkány mezentériumból izolált endotélsejtek, von Willebrand faktor (VIII-as faktor) jelenléte (FITC jelölés).
8. Arterioláris és venuláris endotélsejtek eNOS és β -aktin tartalma.
9. eNOS és β -aktin – reprezentatív Western blot.
10. Arterioláris és venuláris endotélsejtek NOS aktivitása.
11. Arterioláris és venuláris endotélsejtek L-arginin koncentrációja.
12. Arterioláris és venuláris endotélsejtek L-arginin transzportja.
13. Arterioláris (AA), venuláris (VV), artériás(A), vénás (V) erek eNOS tartalma.
14. PAEC cGMP termelésének koncentráció-függő gátlása dohányfüsttel.
15. PAEC cGMP termelésének időfüggő gátlása dohányfüsttel.
16. GSH védő hatása PAEC cGMP termelésére dohányfüst jelenlétében.
17. Glutation-fogyás formaldehid hatására.
18. Fehérjecsík (molekulasúly: ~270 kD) denzitásának eltűnése dohányfüst-puffer hatására trombocitákban.
19. Fehérjecsík (molekulasúly: ~270 kD) időfüggő eltűnése dohányfüst-puffer hatására.
20. Inszulin-kiváltotta, koncentráció-függő kemilumineszcencia trombocitákban.
21. Inszulin-kiváltotta, dóziszfüggő kemilumineszcencia trombocitákban (görbe alatti terület).
22. L-NAME dóziszfüggő gátló hatása az inszulin-kiváltotta kemilumineszcenciára trombocitákban.
23. L-NAME dóziszfüggő gátló hatása az inszulin-kiváltotta kemilumineszcenciára trombocitákban (görbe alatti terület).
24. Szuperoxid dizmutáz dóziszfüggő gátló hatása az inszulin-kiváltotta kemilumineszcenciára trombocitákban.
25. Szuperoxid dizmutáz dóziszfüggő gátló hatása az inszulin-kiváltotta kemilumineszcenciára trombocitákban (görbe alatti terület).
26. Arginin és glükóz reakciója 90 °C-on.
27. A vas katalizáló hatása az arginin-glükóz reakcióra.
28. ESR metodikával az arginin és glükóz reakciója során keletkezett szabad gyököt nem lehet kimutatni testhőmérsékleten.

29. L-arginin transzport időfüggése HDMVEC-ben.
30. Összefüggés a plazma HDMVEC sejtek NOS aktivitását befolyásoló hatása, a plazma ADMA, SDMA, kreatinin és urea szintek között kontrollokban és KVB-ben szenvedőkben.
31. HDMVEC Western blot – az eNOS protein mennyiségének változása 6 óra, 20%-os plazmával történt inkubáció után, kontrollokból és krónikus vesebetegtegekből származó, normál és alacsony NOS aktivitást kiváltó plazmával.
32. Kontrollokból és urémiásokból (PD-peritoneálisan dializált, HD-hemodializált) származó plazma 20%-os oldatának hatása 6 órás inkubáció után az L-arginin transzportra HDMVEC, HGEC, BTAEC sejtekben.
33. Különböző anyagok kompetíciója akut inkubáció során az L-arginin transzporterekért HDMVEC sejtekben.
34. Urea (25 és 50 mM) és ozmotikus kontrollja (glükóz, 25 mM és 50 mM) hatása endotélsejtek (HDMVEC, HGEC, BTAEC) L-arginin transzportjára 6 órás inkubáció után.
35. Különböző koncentrációjú urea hatása az L-arginin transzportra BTAEC-ben.
36. BTAEC lizátumok reprezentatív Western blot-ja 7 napos inkubáció után szokványos tápfolyadékkal kontroll, vagy 25 mM ureával a szokványos tápfolyadéokban, vagy ozmotikus kontrollként, 25 mM mannitollal a szokványos tápfolyadéokban.
37. Plazma urea szintek 2 egészséges és 3 napig 30%ureával etetett 2 patkányban, 24 órán keresztül, 6 órás időközökben levett vérmintákból.
38. Akut szisztémás NOS gátlás (L-NAME) hatása a vérnyomásra, renális vaszkuláris rezisztenciára, glomeruláris filtrációs rátára és a vizelet nátrium ürítésére 7 napig ureával etetett állatokban.
39. Reprezentatív Western blot – eNOS fehérje pozitív kontrollban, patkány vesekéreg homogenizátumból (2 kontroll állat, 3 ureával etetett állat).
40. Az L-arginin – NO rendszer károsodása urémiában.
41. A krónikus vesebetegséghez és hipertóniához vezető mechanizmus.

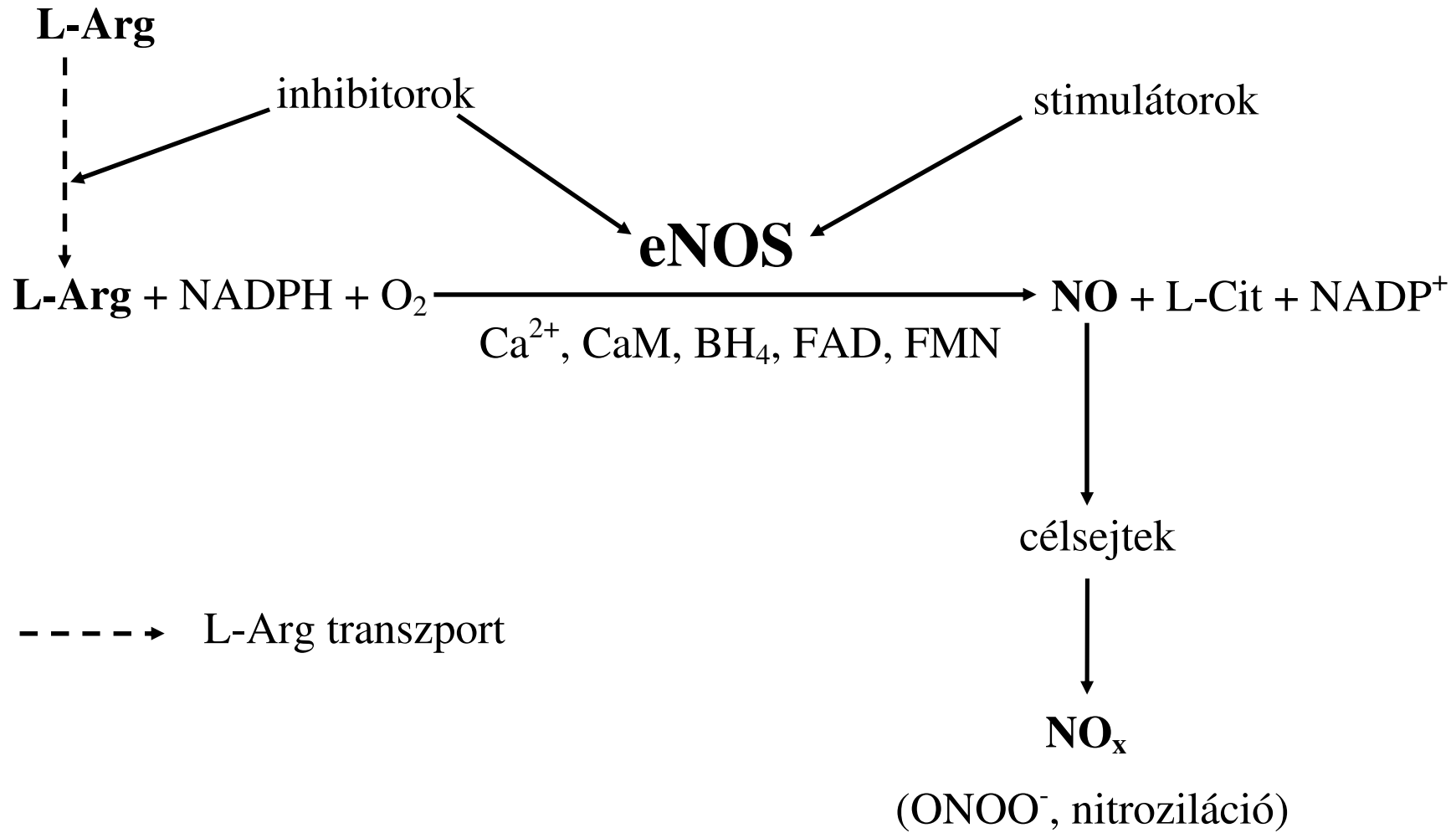
TÁBLÁZATOK

1. Néhány fontosabb L-arginin metabolit normál szintje emberi plazmában.
2. Néhány fontosabb L-arginin metabolit normál szintje emberi vizeletben.
3. A vérnyomás és a vesefunkciós paraméterek KVB-ben szenvedő betegekben és kontrollokban.
4. Krónikus vesebetegségben szenvedők és kontrollok plazmájának hatása HDMVEC sejtek NOS aktivitására.
5. Urémiás betegek néhány klinikai és biokémiai jellemzője.
6. Urémiásokban előforduló koncentrációjú ureamennyiség hatása a NOS aktivitásra, az L-arginin transzportra és az intracelluláris L-arginin koncentrációra endotélsejtekben.
7. Kontroll és 7 napig ureával etetett patkányok vizelettel ürített $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ mennyisége és a teljes ürített fehérjemennyiség gyűjtött vizeletből. Mértük továbbá a plazma urea szintet, az átlagvérnyomást, a renális vaszkuláris rezisztenciát, a renális plazmaáramlást, a glomeruláris filtrációs rátát, a vizelettel ürített Na mennyiséget és a vizelet ozmolalitást az akut vesefunkciós vizsgálatok során.
8. In vitro mérések a vesekéregben, kontroll és 7 napig ureával etetett patkányokban: vizsgáltuk a szöveti L-arginin koncentrációt, az endoteliális és neuronális NOS fehérjék mennyiségét és a NOS aktivitást a szolubilis frakcióban.
9. A vizelettel ürített NO_x , cGMP és ET mennyisége IgA nefropátiás betegekben és egészséges kontrollokban. 24 órás sterilen gyűjtött vizeletből.



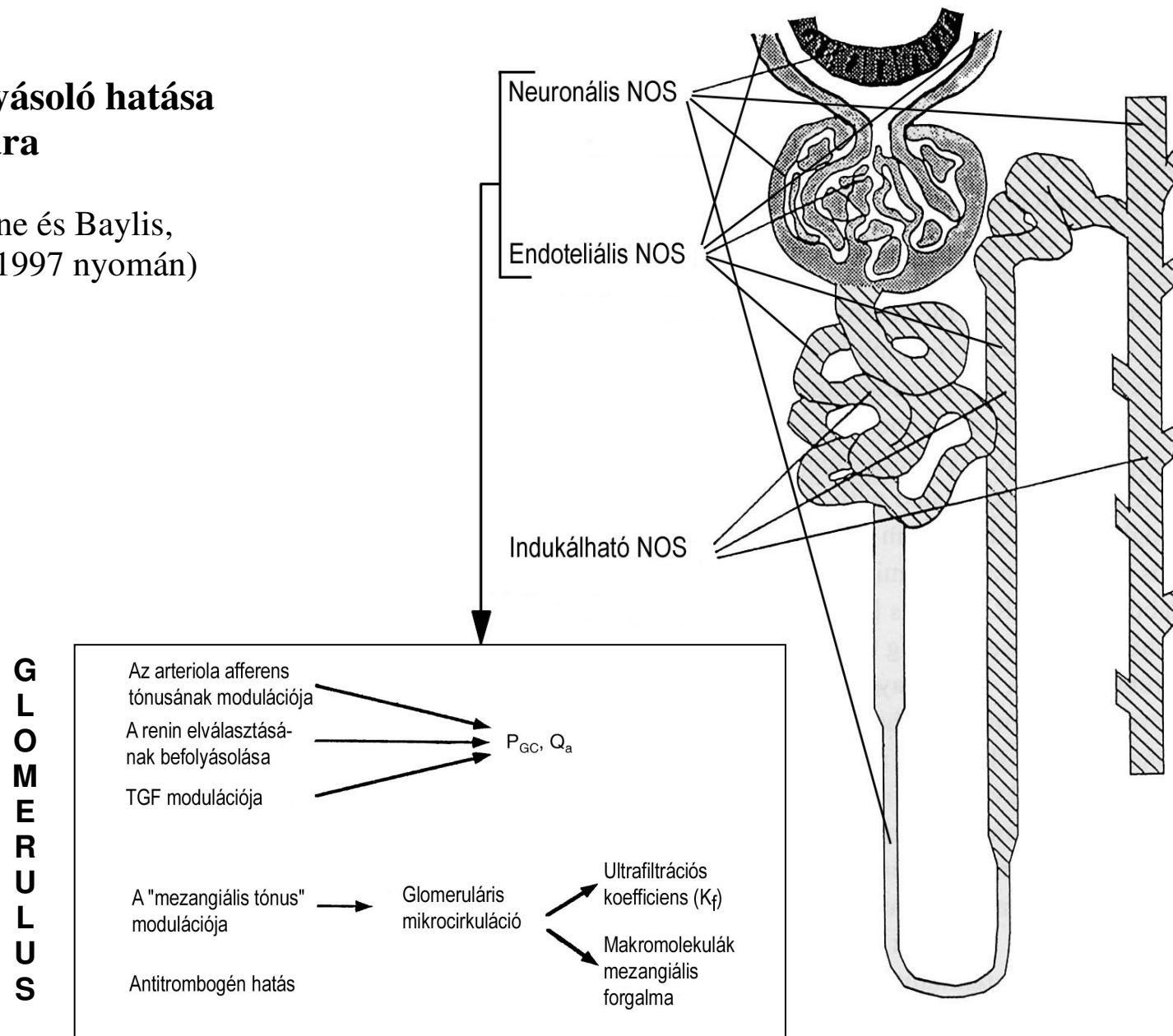
1. ábra. Az arginin metabolizmusa. Rövidítések: ADK: arginin dekarboxiláz; ADMA: aszimmetrikus dimetil-arginin; AGAT: arginin-glycin amidinotranszferáz; AL: arginoszukcinát liáz; AtS: arginil-tRNS szintetáz; AS: arginoszukcinát szintetáz; DAO: diaminoxidáz; DDAH: dimetilarginin dimetilaminohidroláz; L-arg: L-arginin; L-cit: L-citrullin; L-glu: L-glutaminsav; L-NMA: N^G-monometil-L-arginin; L-orn: L-ornitin; L-pro: L-prolin; NO: nitrogén monoxid; NOS: nitrogén monoxid szintetáz; OAT: ornitin aminotranszferáz; ODK: ornitin dekarboxiláz; OTK: ornitin transzkarbamiláz; PRMT: protein-arginin metiltranszferáz; P5C: pirrolin-5-karboxilát; SDMA; szimmetrikus dimetil-arginin. Az OTK enzim csak hepatocitákban és vékonybél epiteliális sejtekben fordul elő. Az ábra közepén a szaggatott kör az urea ciklust jelzi. (Az ábra az ismert interakciókat az áttekinthetőség kedvéért nem mutatja; ezeket lásd a szövegben).

2. ábra: Az L-arginin-NO rendszer



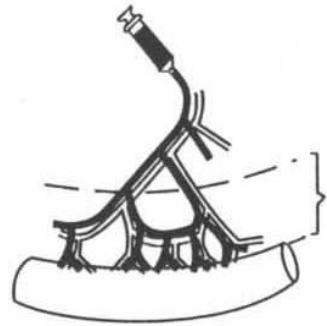
3. ábra: Az NO befolyásoló hatása a vese hemodinamikára

(Rajj és Baylis, 1995, Kone és Baylis, 1997 és Aiello és mtsai., 1997 nyomán)



4. ábra: Arteriális endotélsejtek (RMAEC) izolálása patkány mezentériumból

1. A vénás hálózat feltöltése vasrészecskékkel



2. Szövetek kimetszése
3. Őrlés



4. Kollagenáz kezelés



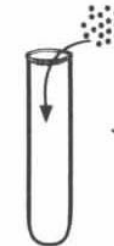
5. A vasrészecskékkel töltött erek mágneses elkülönítése

A vasrészecskékkel töltött vénás szegmensek eldobása

vasmentes artériás szegmensek és szabad sejtek



szűrés
centrifugálás



7. Anti-PECAM-1 Dynabead hozzáadása

inkubáció



8. A gyöngyökhöz kötött sejtek mágneses elkülönítése

9. A gyöngyökhöz kötött sejtek reszuszpenziója tápfolyadékban

A többi sejt eldobása

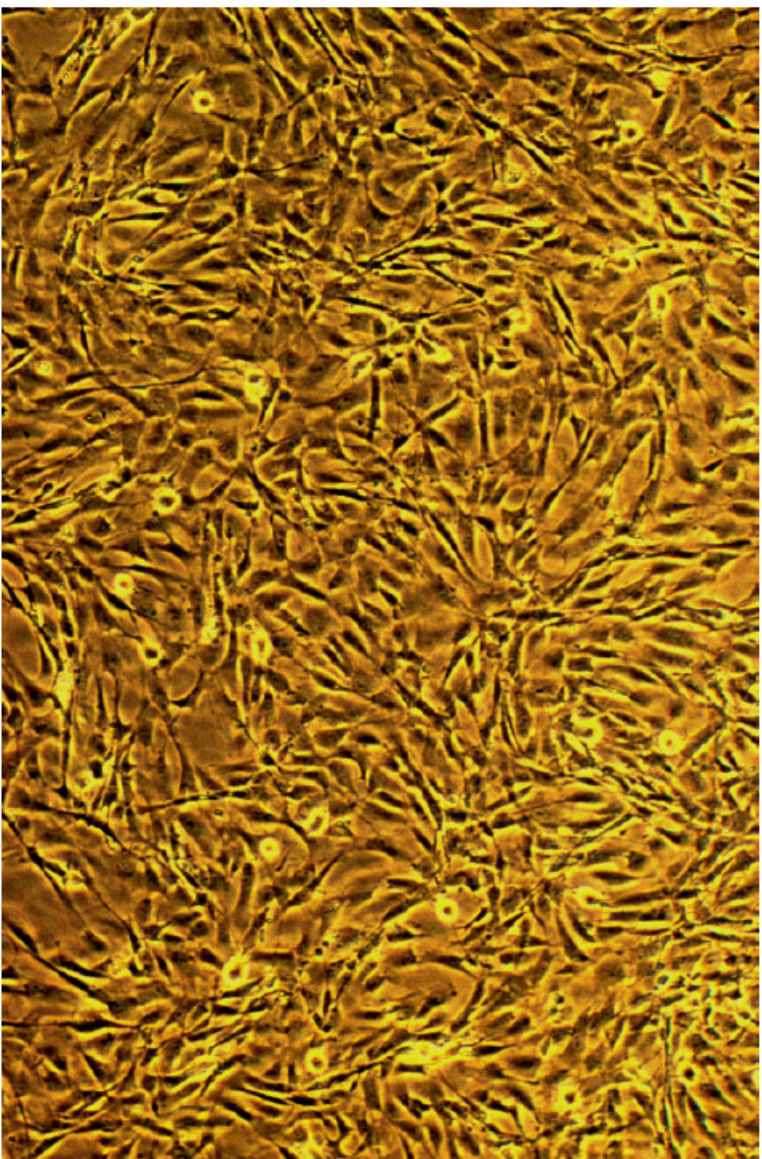


10. Sejtenyésztés flaskákban

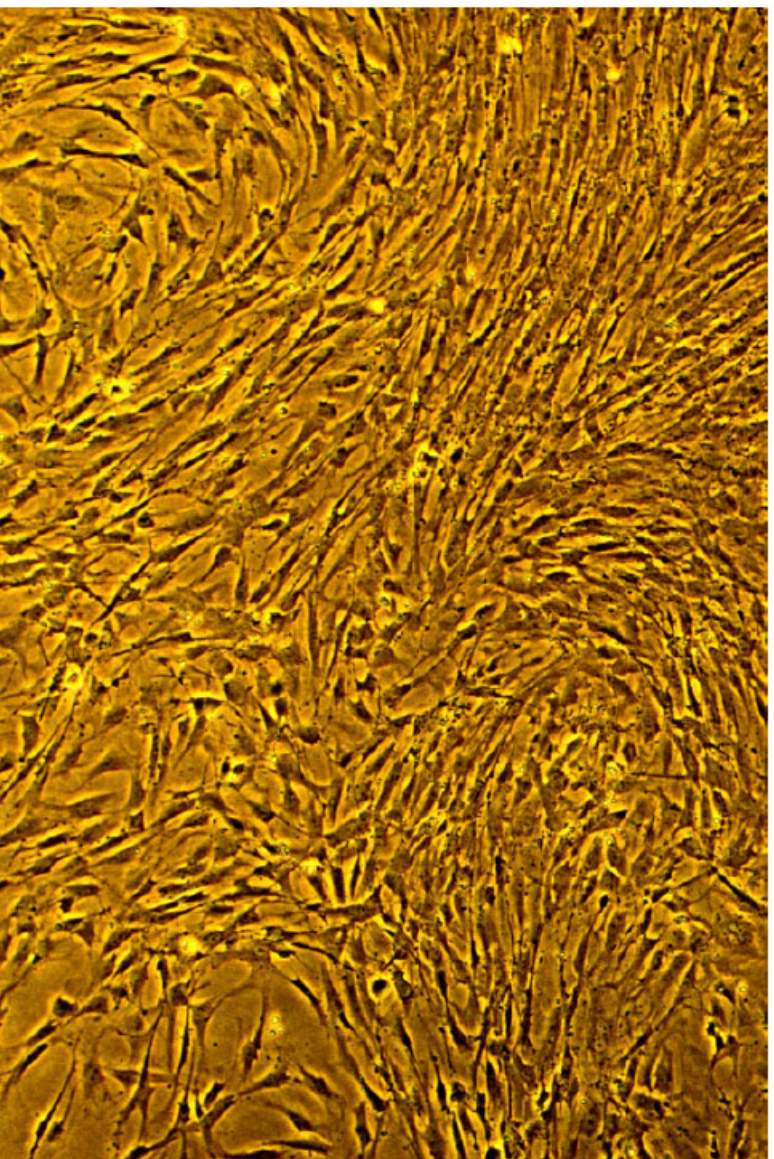
Sejtenyésztés és az endotélsejtek identifikálása

**5. ábra: Patkány mezentériumból izolált endotélsejtek
natív fáziskontraszt mikroszkópos képe**

A. Arteriális endotélsejtek (RMAEC)

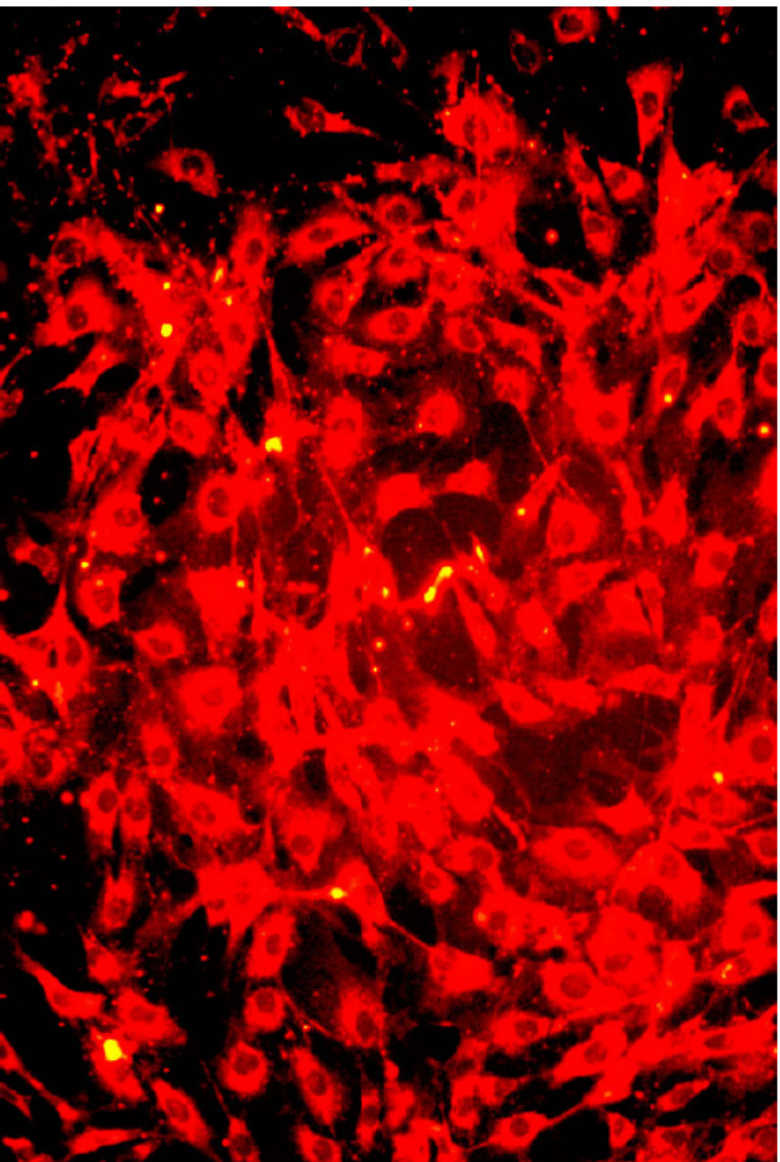


B. Venuláris endotélsejtek (RMVEC)

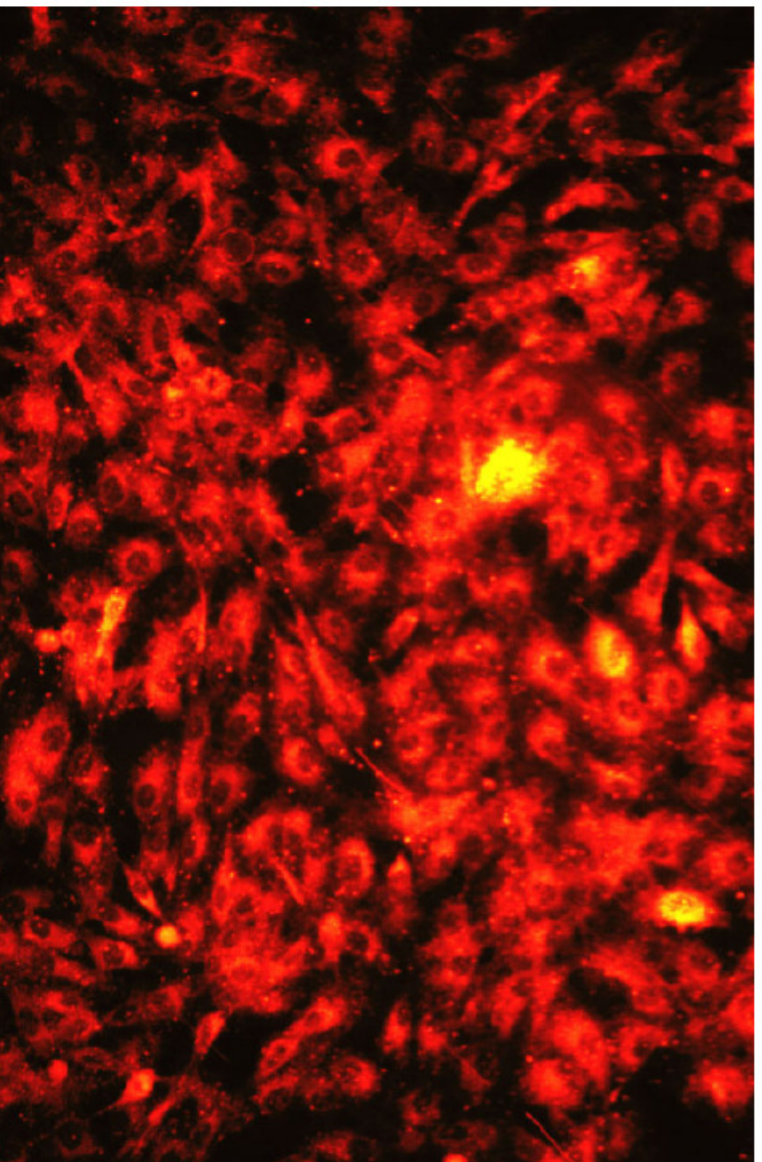


**6. ábra: Patkány mezentériumból izolált endotélsejtek,
oxidált LDL felvétel (fluorescens rodamin festés)**

A. Arterioláris endotélsejtek (RMAEC)

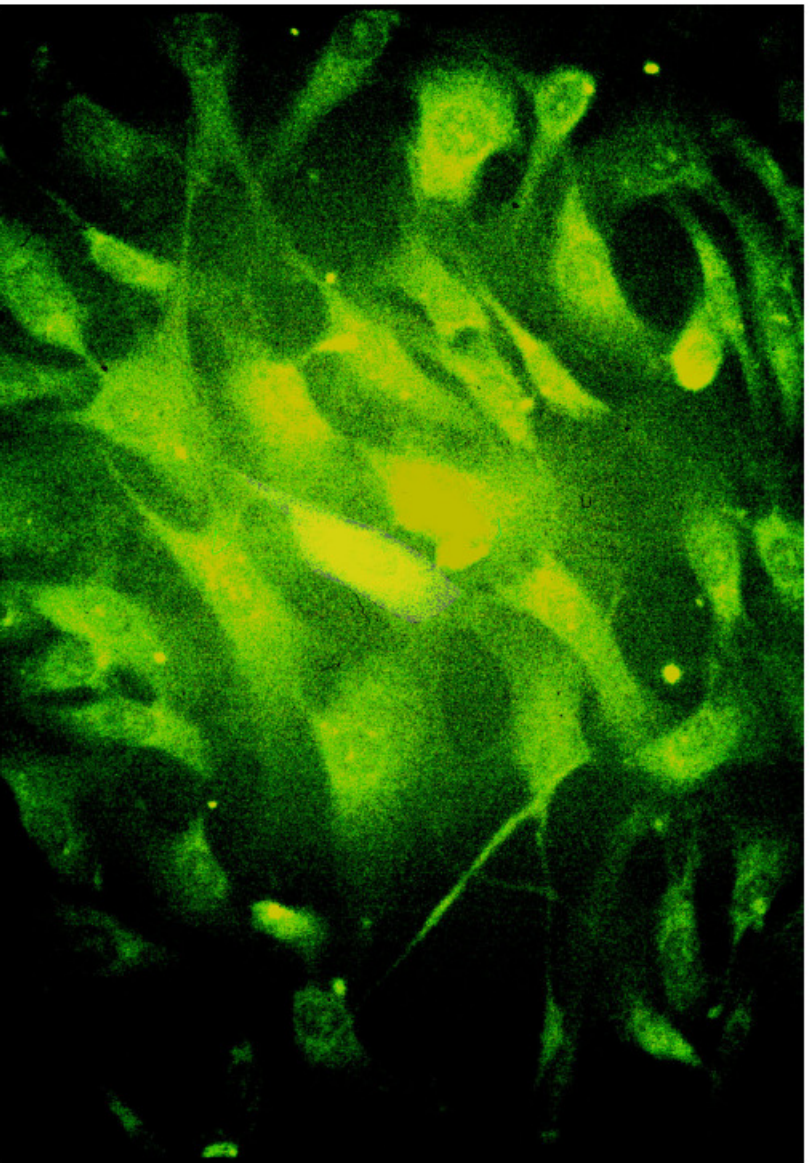


B. Venuláris endotélsejtek (RMVEC)

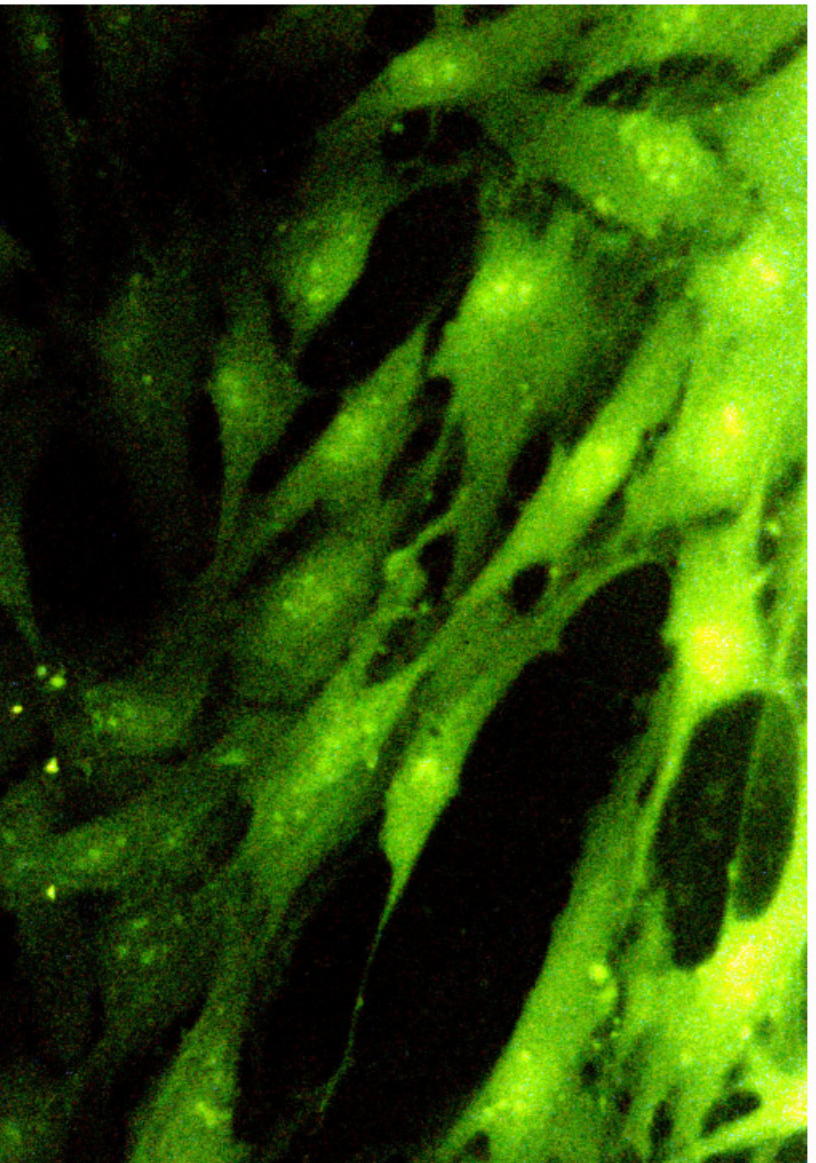


**7. ábra: Patkány mezentériumból izolált endotélsejtek,
von Willebrand faktor (VIII-as faktor) jelenléte (FITC jelölés)**

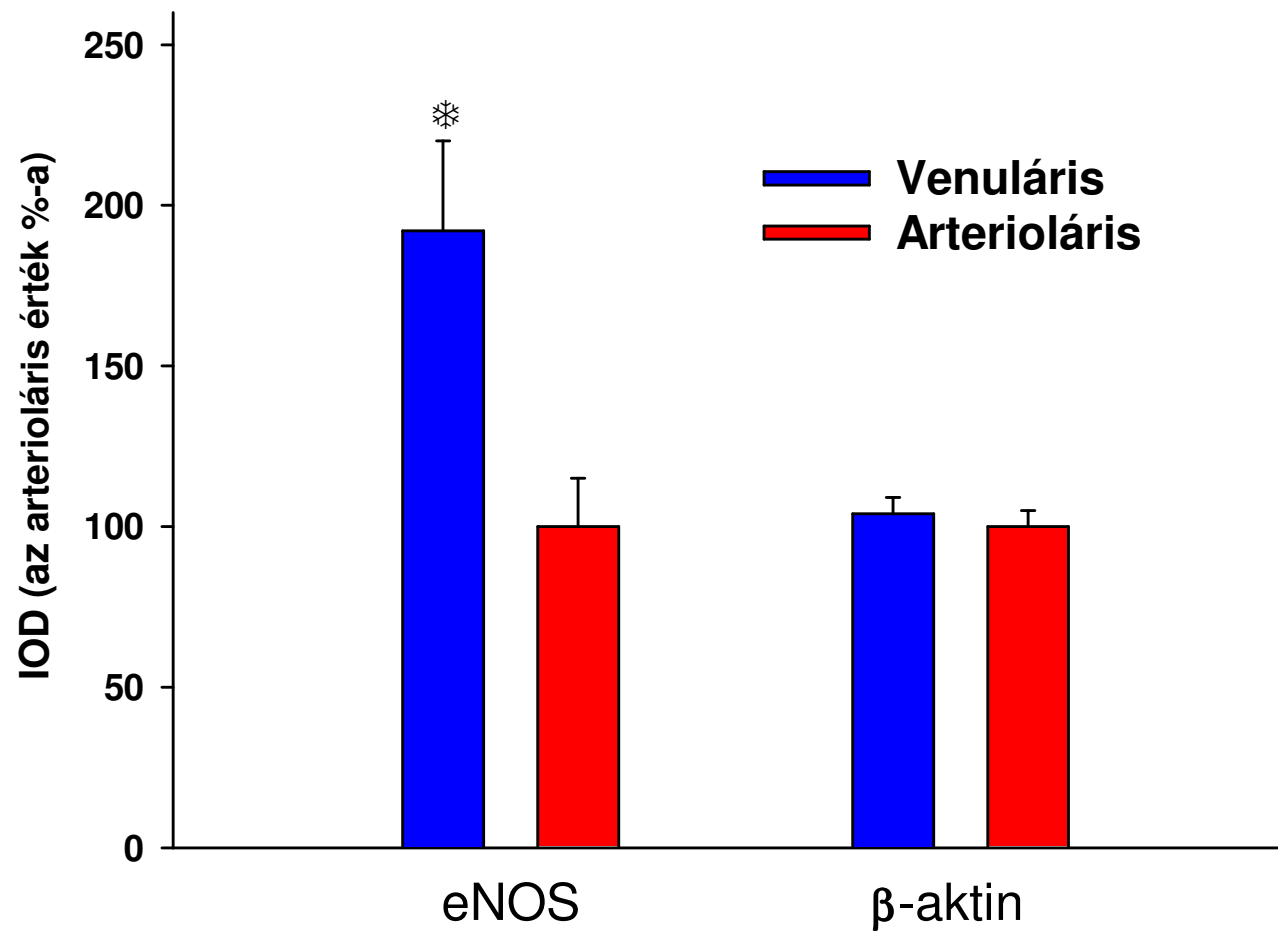
A. Arteriális endotélsejtek (RMAEC)



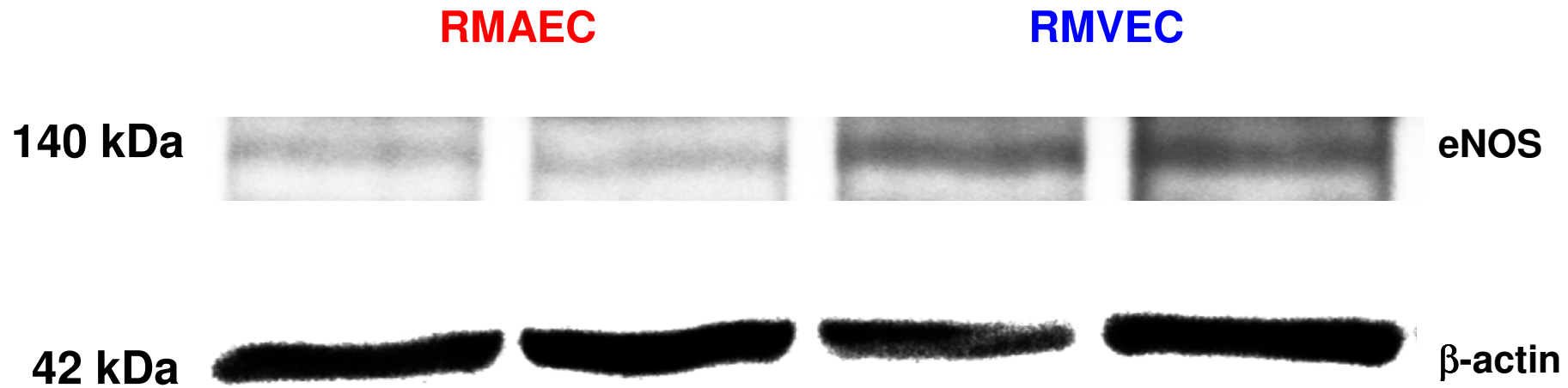
B. Venuláris endotélsejtek (RMVEC)



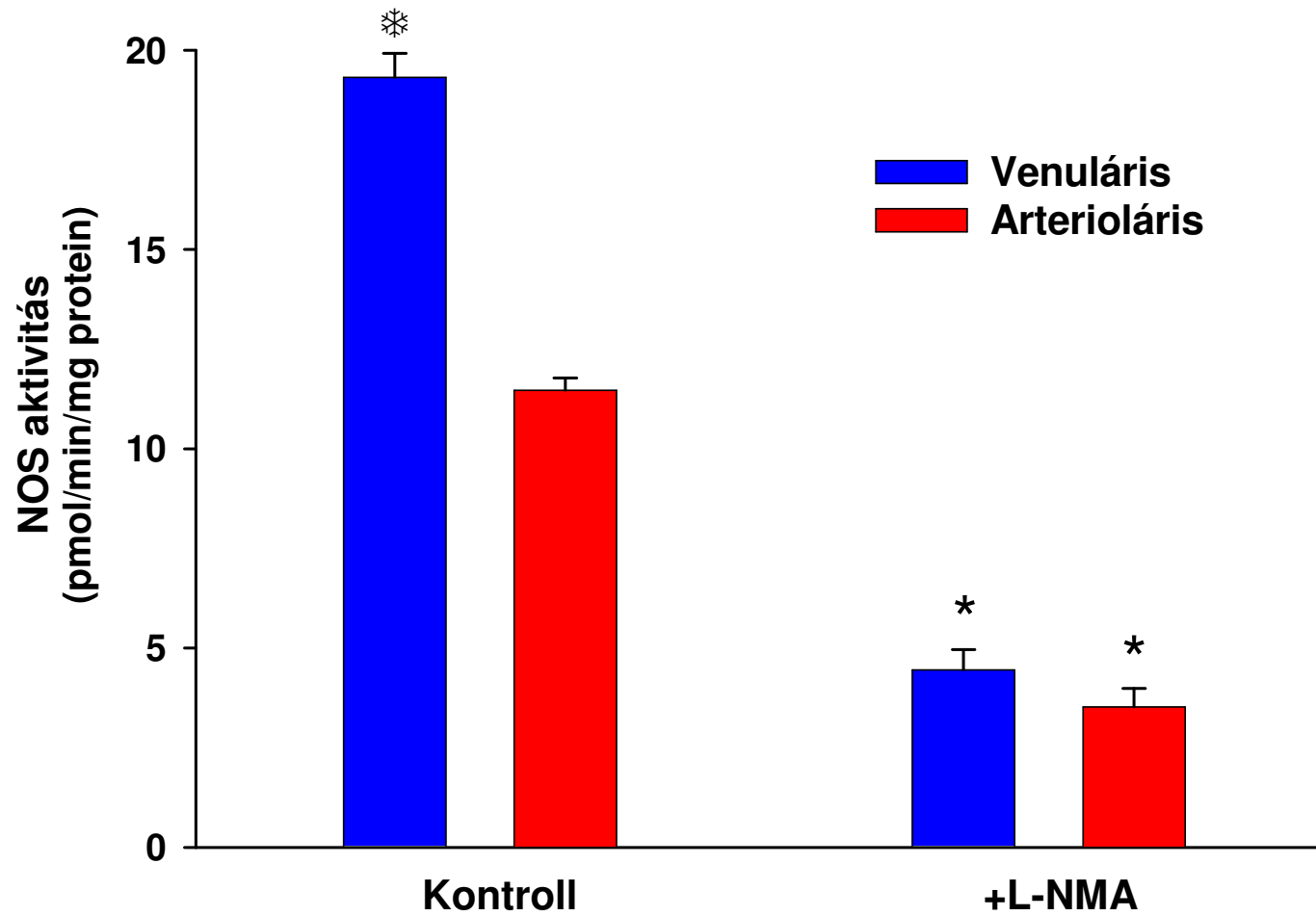
8. ábra: Arteriális és venuláris endotélsejtek eNOS és β -aktin tartalma



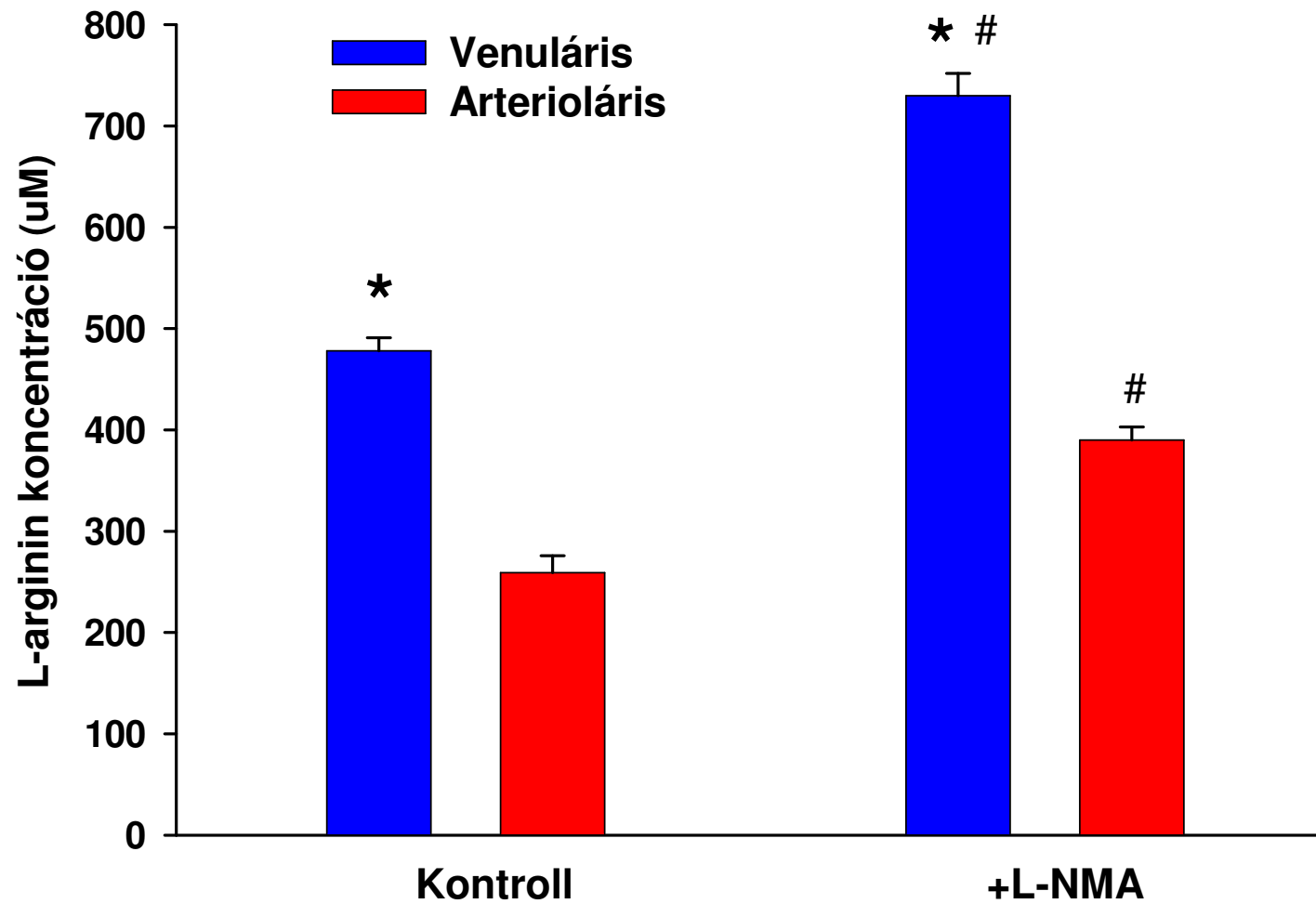
9. ábra: eNOS és β -aktin - reprezentatív Western blot



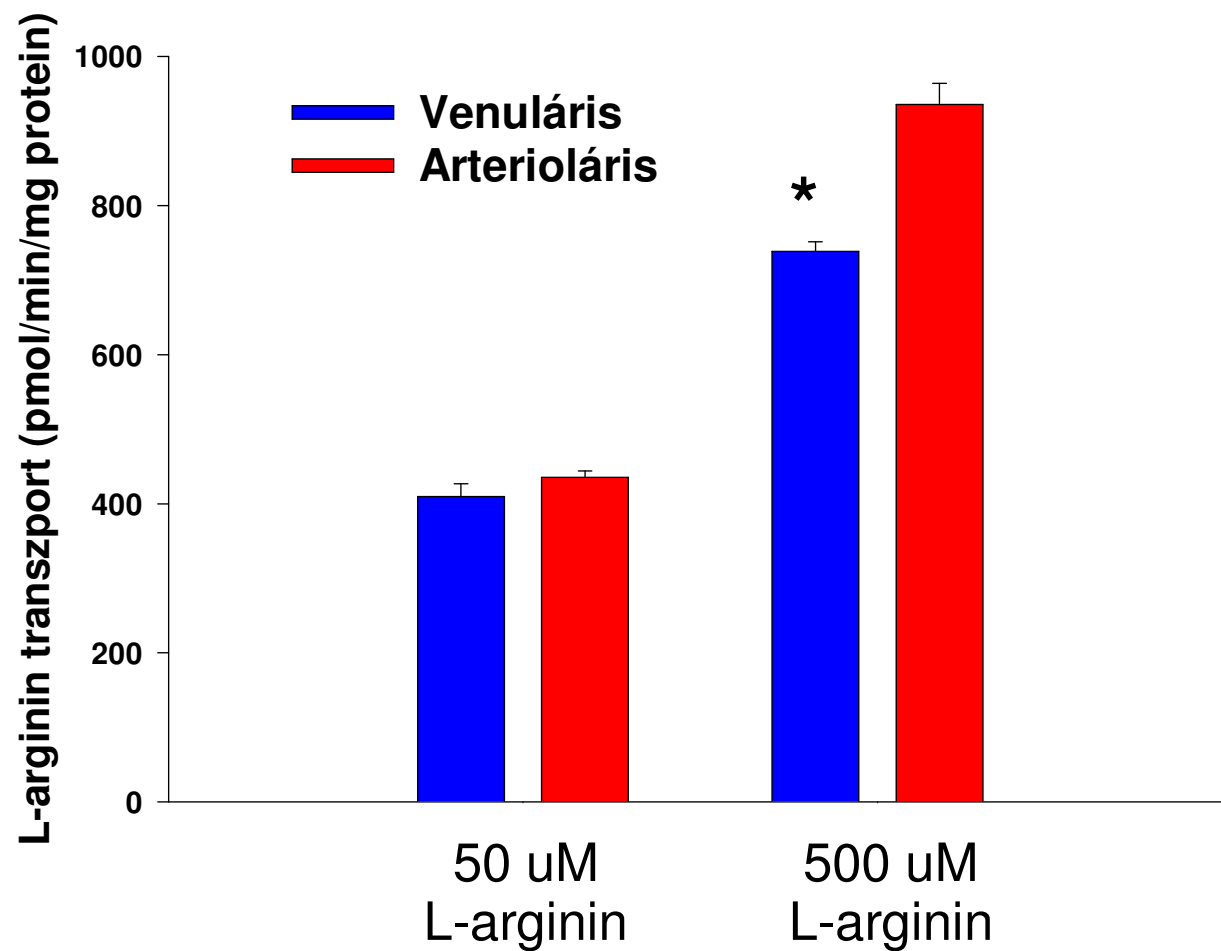
10. ábra: Arteriális és venuláris endotélsejtek NOS aktivitása



11. ábra: Arteriális és venuláris endotélsejtek L-arginin koncentrációja

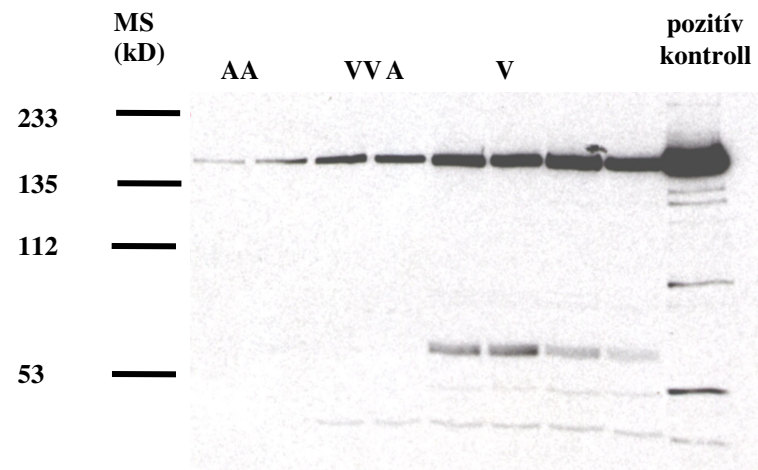


12. ábra: Arteriális és venuláris endotélisejtek L-arginin transzportja

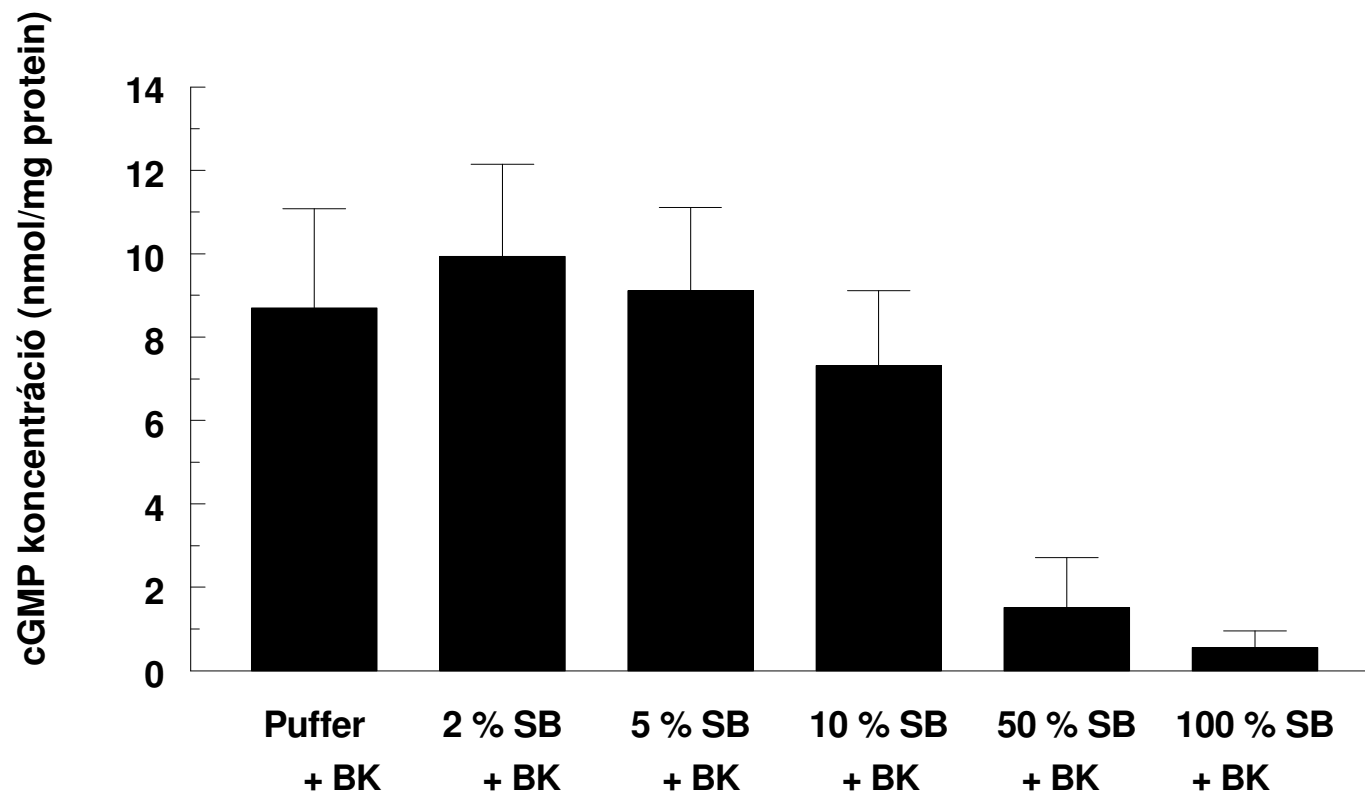


**13. ábra: Arterioláris (AA), venuláris (VV), artériás (A) és vénás (V) erek
eNOS tartalma**

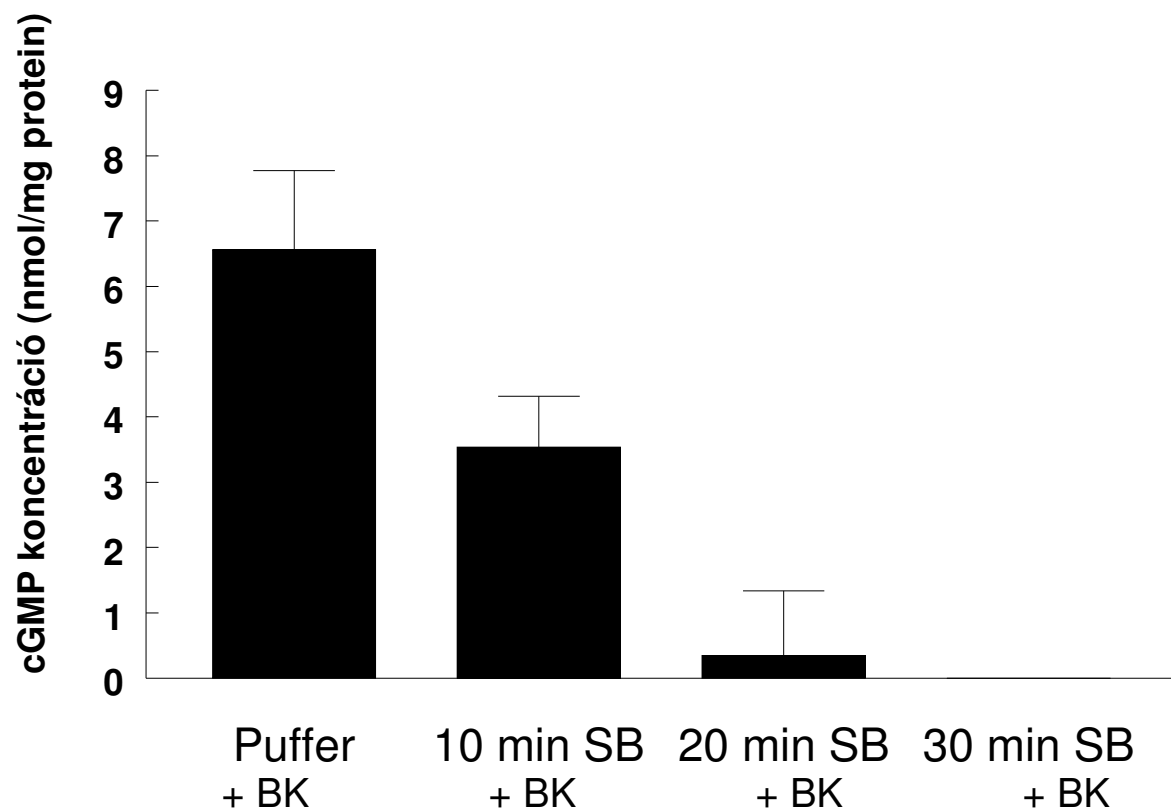
**(minden csoportban 2-2 minta, a minták 10-10 patkány mezentériuma ereinek homogenizátumai,
45-45 µg össz-fehérje/oszlop)**



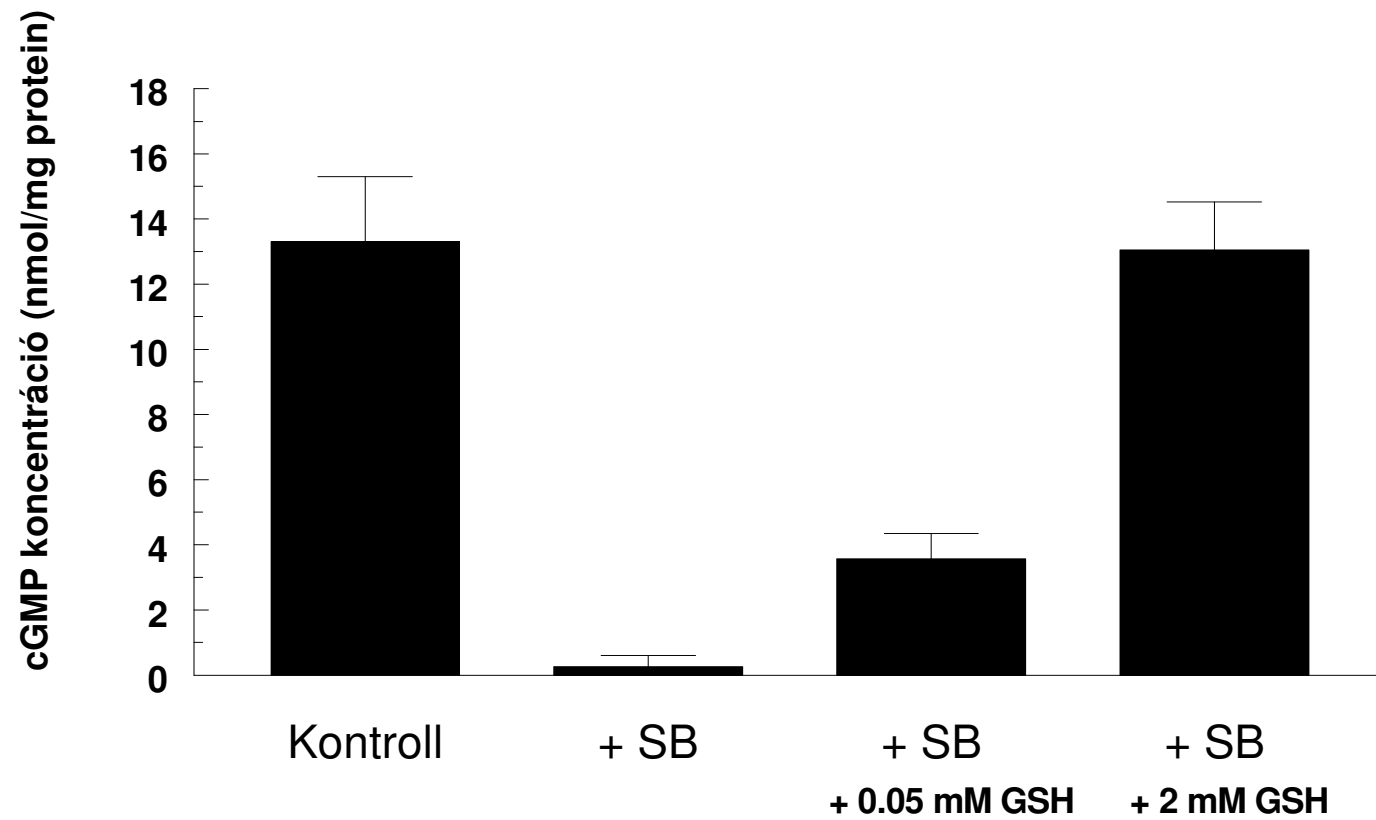
**14. ábra: PAEC cGMP termelésének koncentráció-függő gátlása dohányfüsttel
(Puffer= Krebs-HEPES puffer, SB= dohányfüst puffer, BK= bradikinin)**



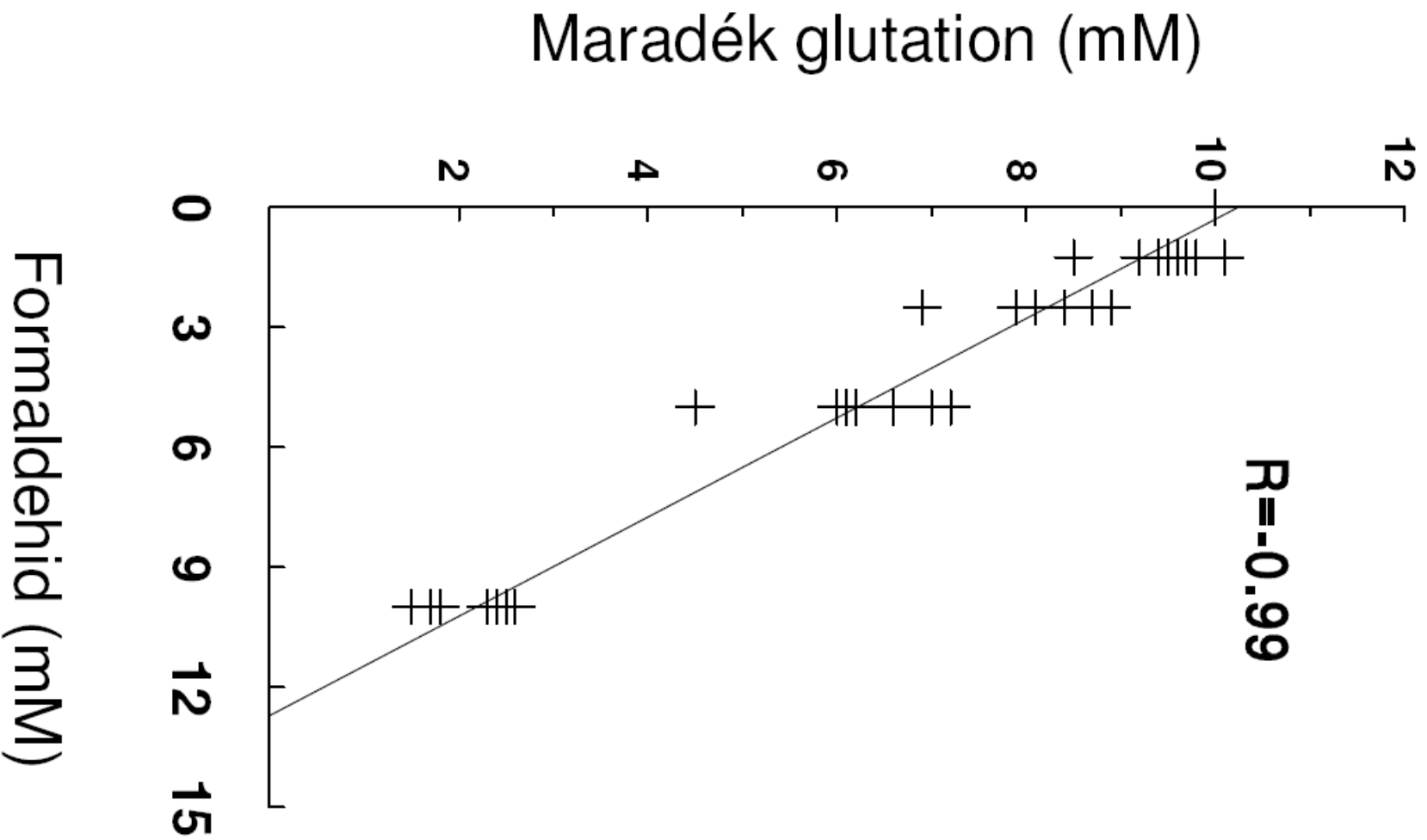
**15. ábra: PAEC cGMP termelésének időfüggő gátlása dohányfüsttel
(Puffer= Krebs-HEPES puffer, SB= dohányfüst puffer, BK= bradikinin)**



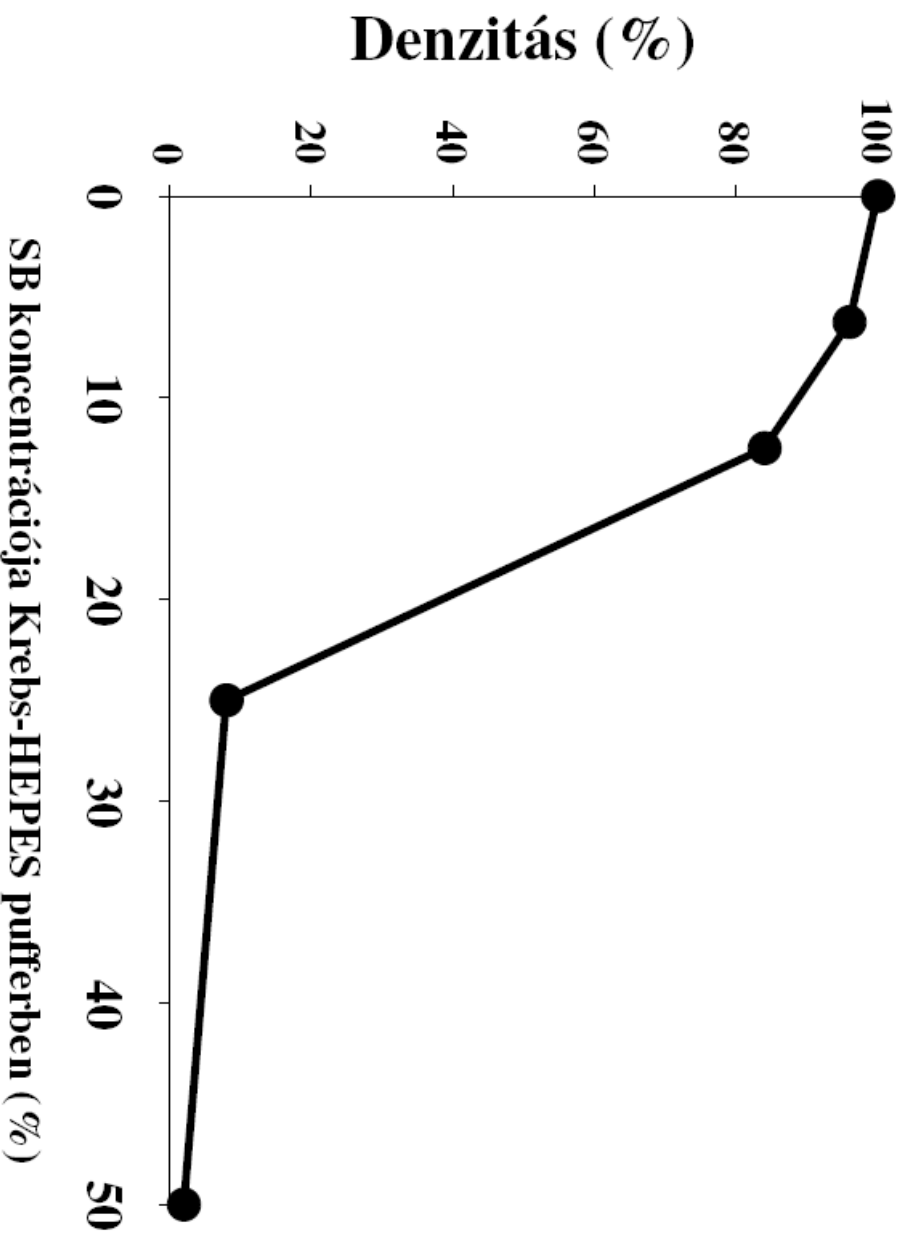
**16. ábra: GSH védő hatása PAEC cGMP termelésére dohányfüst jelenlétében
(Kontroll= bradikinin Krebs-HEPES puffer-oldatban, SB= dohányfüst puffer)**



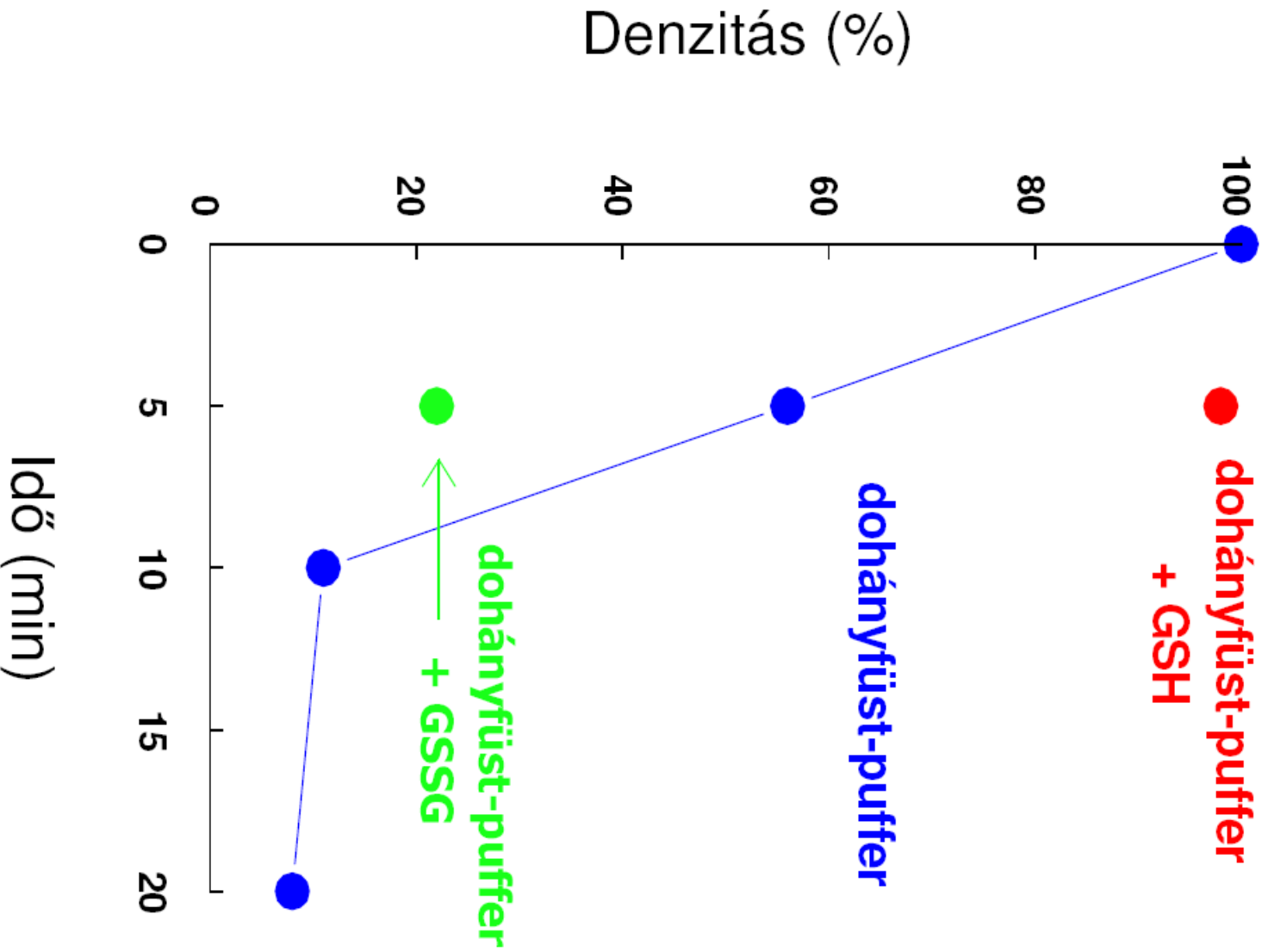
17. ábra: Glutathion-fogyás formaldehid hatására



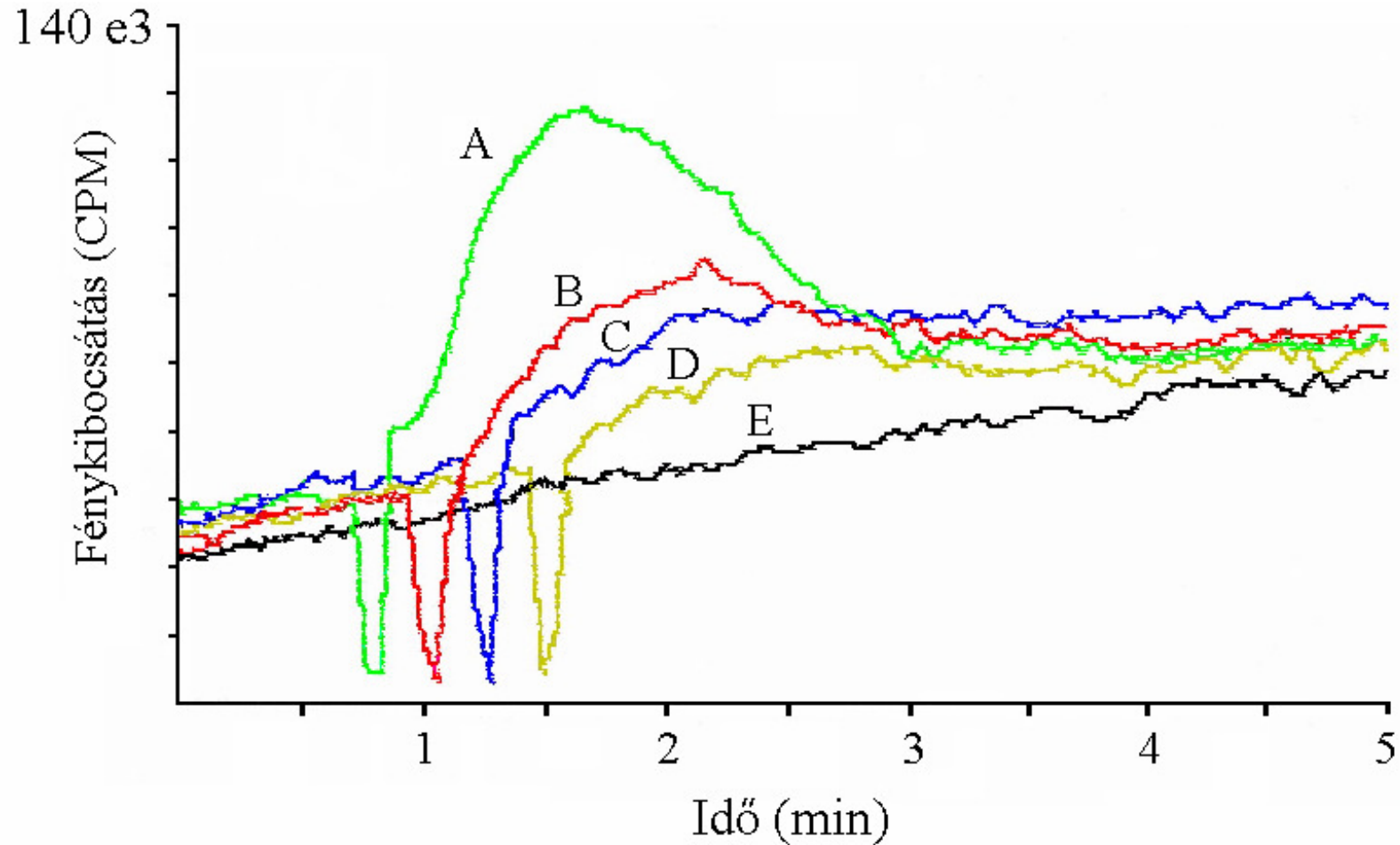
18. ábra: Fehérjecsík (molekulasúly: ~270 kD) denzitásának koncentrációfüggő eltűnése dohányfüst-puffer hatására trombocitákban.



19. ábra: Fehérjecsík (molekulasúly: ~270 kD) időfüggő eltűnése dohányfüst-puffer hatására. Öt perces inkubáció során GSH (5 mM) kivédi ezt, míg GSSG (5 mM) tovább csökkenti a fehérje denzitását PAEC-ben.



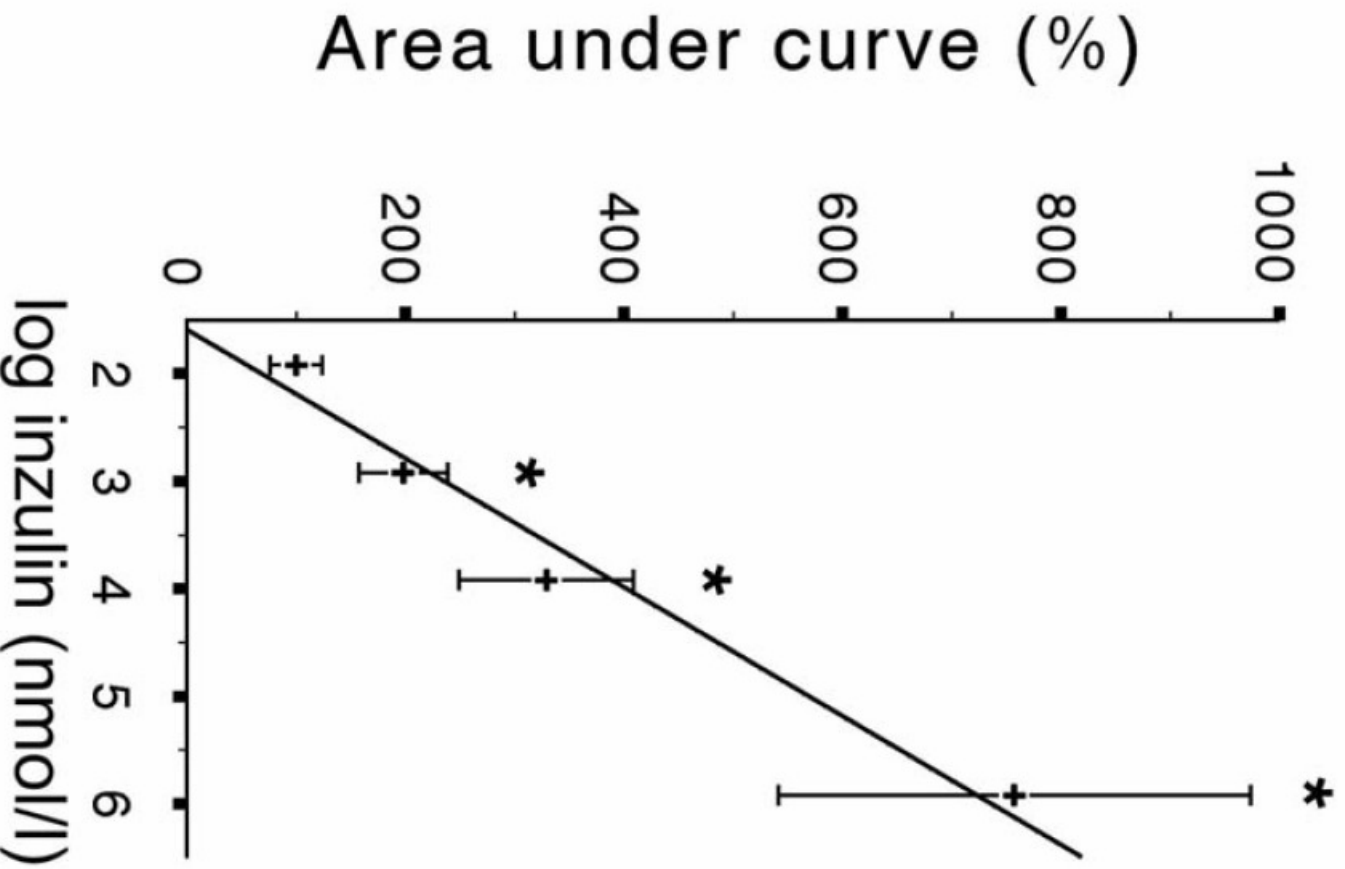
20. ábra: Inzulin kiváltotta, koncentráció-függő kemilumineszcencia trombocitákban



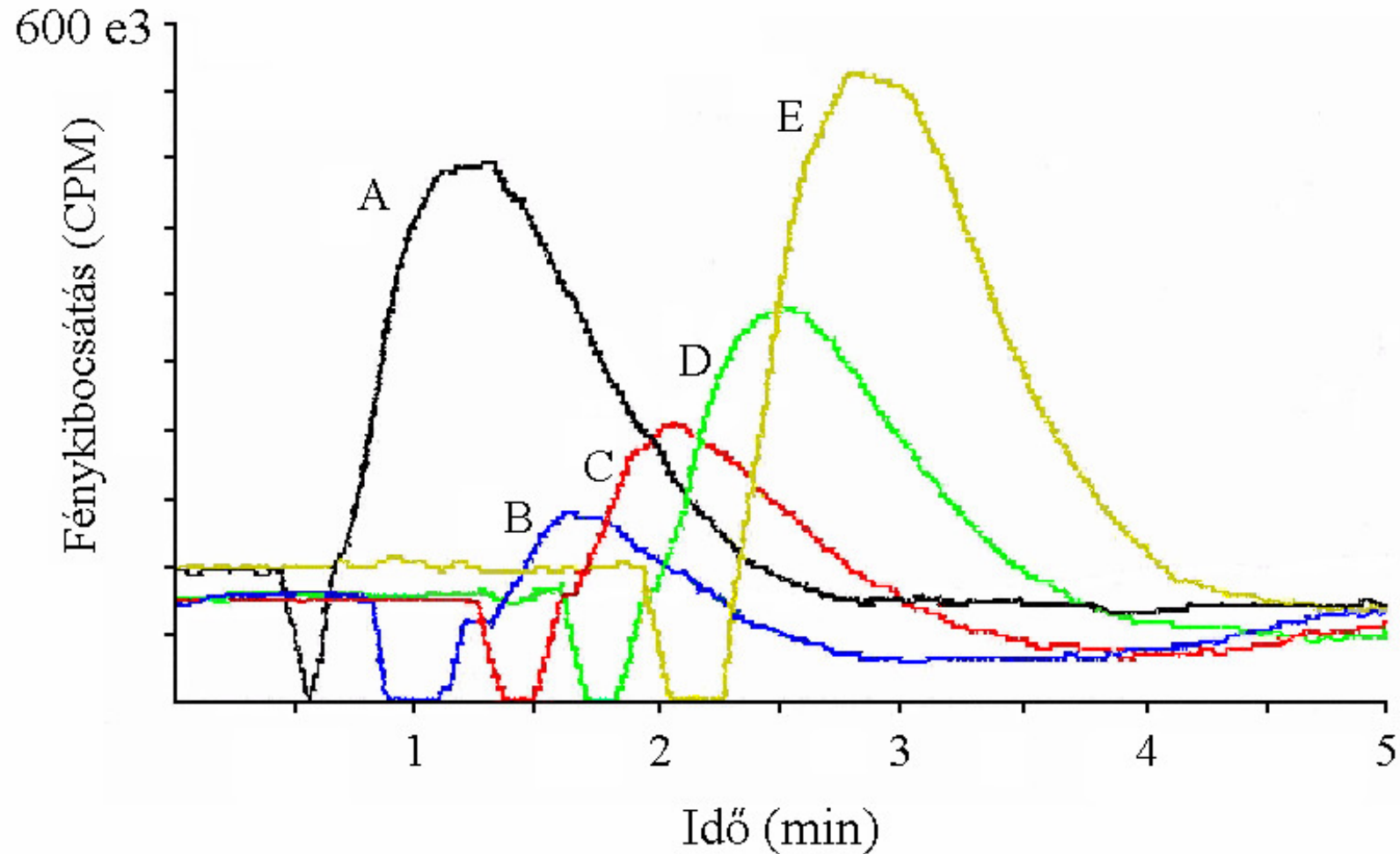
inzulin koncentráció:

A = 840 nmol/l, B = 8.4 nmol/l, C = 840 pmol/l, D = 84 pmol/l, E = kontroll.

21. ábra: Inszulin-kiváltotta, dóziszfüggő kemilumineszcencia trombocitákban. Az inszulin-kiváltotta kemilumineszcencia görbe alatti területei (area under curve) 100%-nak vettük a 84 nM inszulin-kiváltotta kemilumineszcenciát.

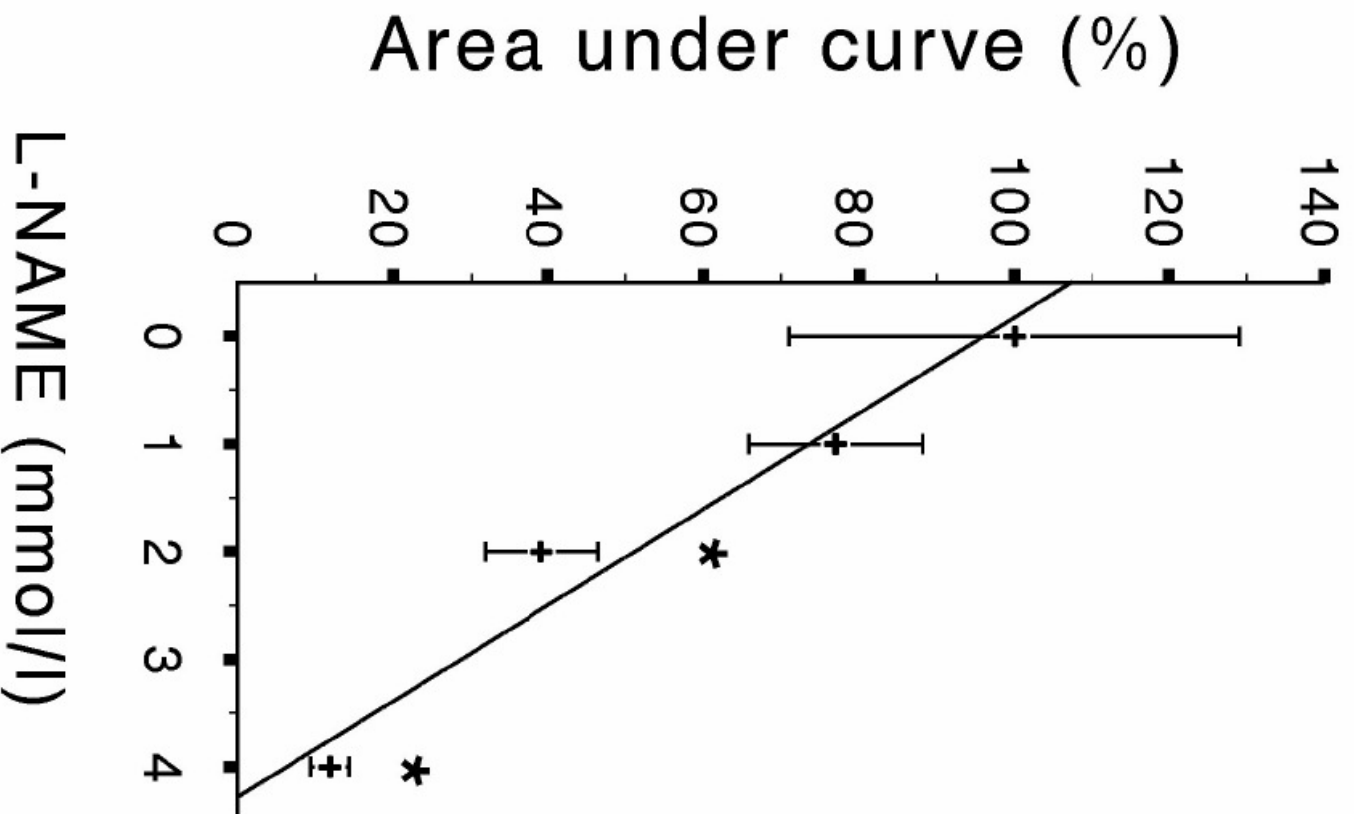


22. ábra: L-NAME dóziszfüggő gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára trombocitákban

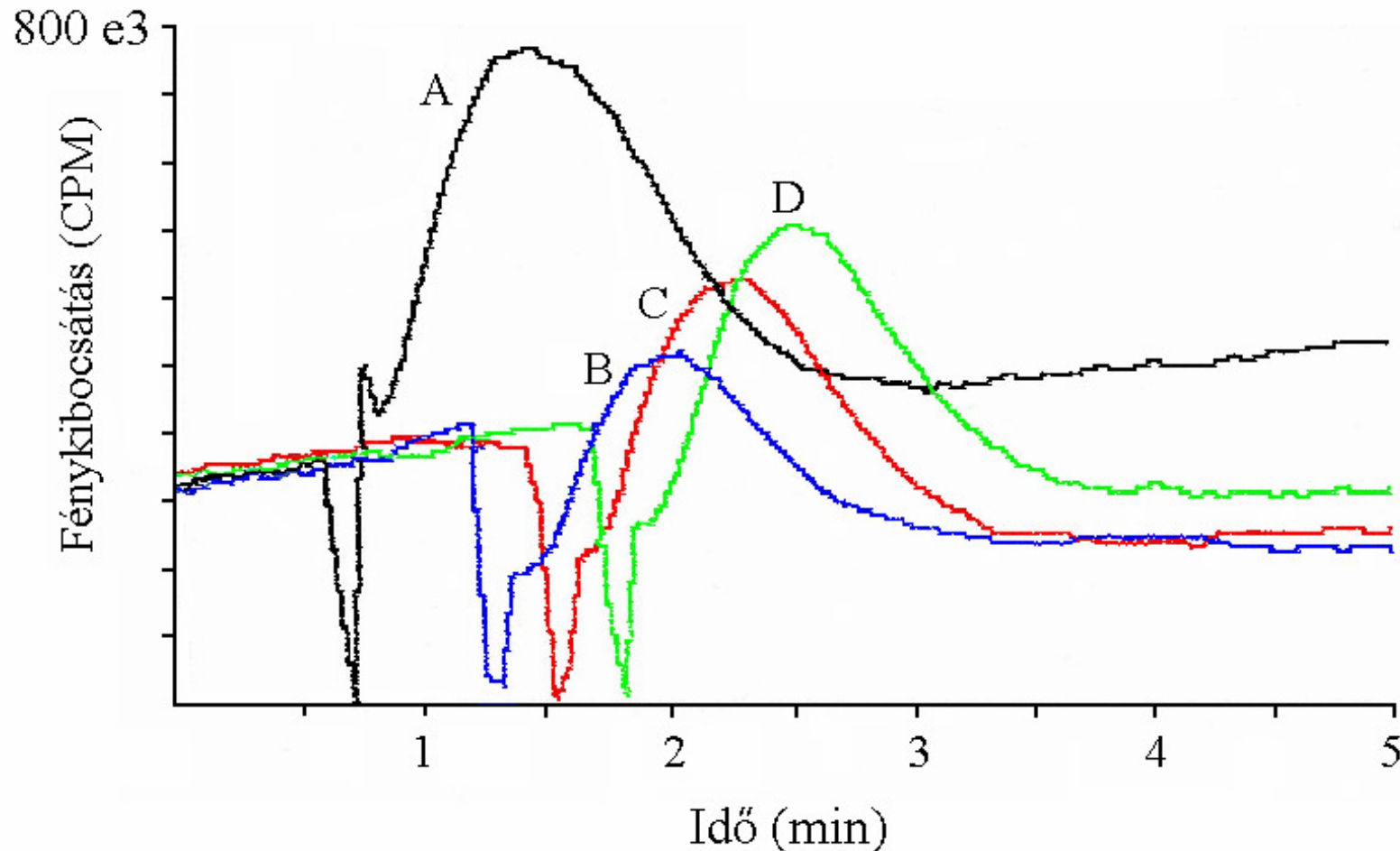


A = 840 nmol/l inzulin kontroll. Hozzáadott L-NAME koncentrációk:
B = 4 mmol/l, C = 2 mmol/l, D = 1 mmol/l, E = 0.5 mmol/l.

23. ábra: L-NAME dózisfüggő gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára, trombocitákban. Az inzulin-kiváltotta kemilumineszcencia görbe alatti területei (area under curve). 100%-nak vettük a 840 nM inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciát.

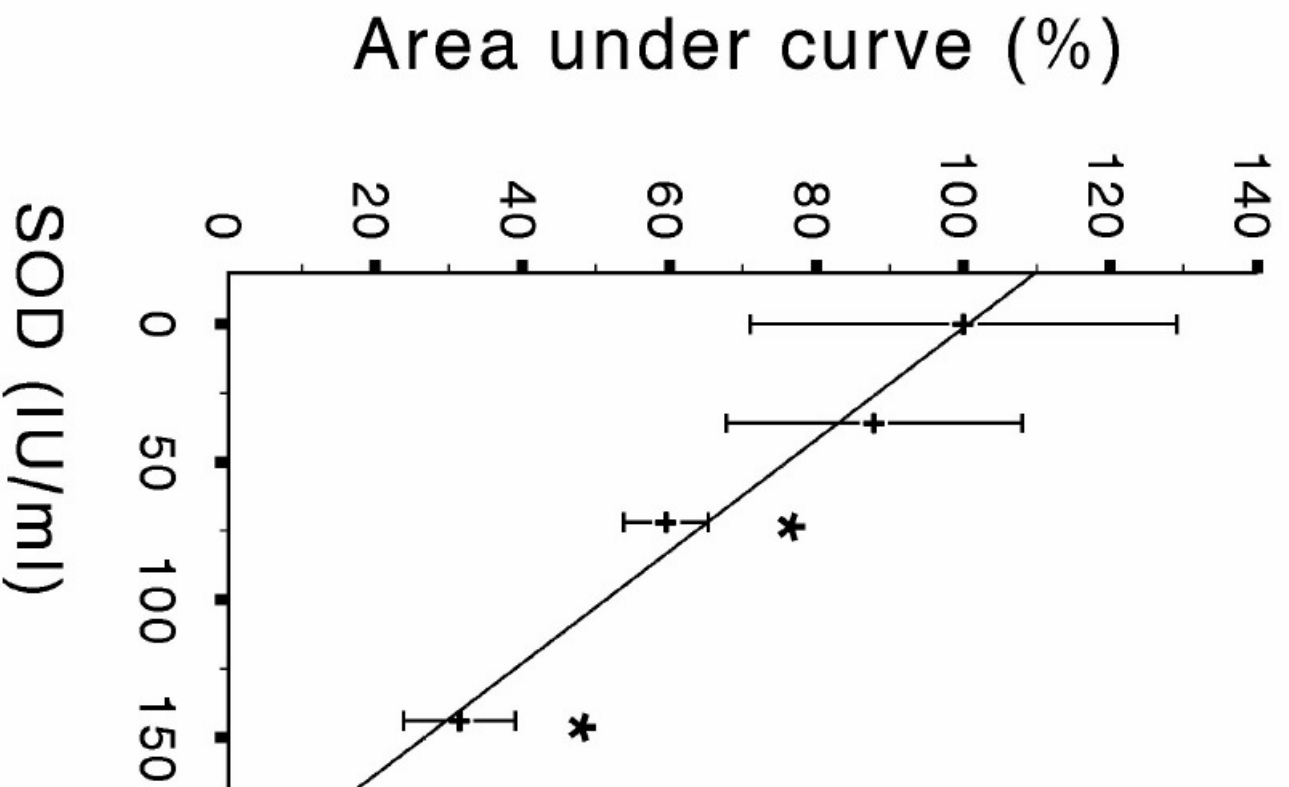


24. ábra: Szuperoxid dizmutáz dózisfüggő gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára trombocitákban



A = 840 nmol/l inzulin kontroll. Hozzáadott SOD koncentrációk:
B = 144 IU/L, C = 72 IU/L, D = 36 IU/L.

25. ábra: Szuperoxid dizmutáz dózisfüggő gátló hatása az inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciára, trombocitákban. Az inzulin-kiváltotta kemilumineszcencia görbe alatti területei (area under curve), 100%-nak vettük a 840 nM inzulin-kiváltotta kemilumineszcenciát.



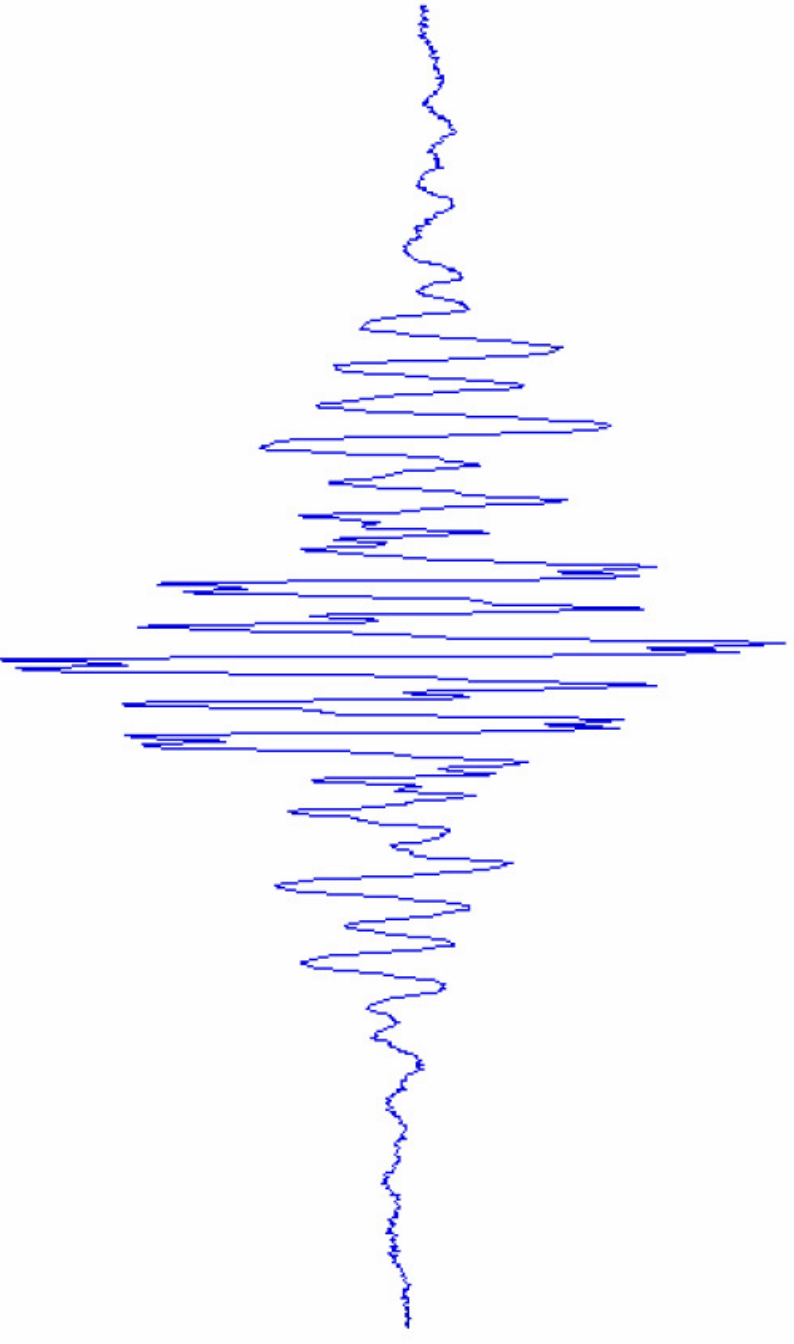
26. ábra: Arginin és glükóz reakciója 90°C-on (ESR görbék; a nyíl a térő irányát és nagyságát jelöli: 5 mT)



1000 mM glükóz

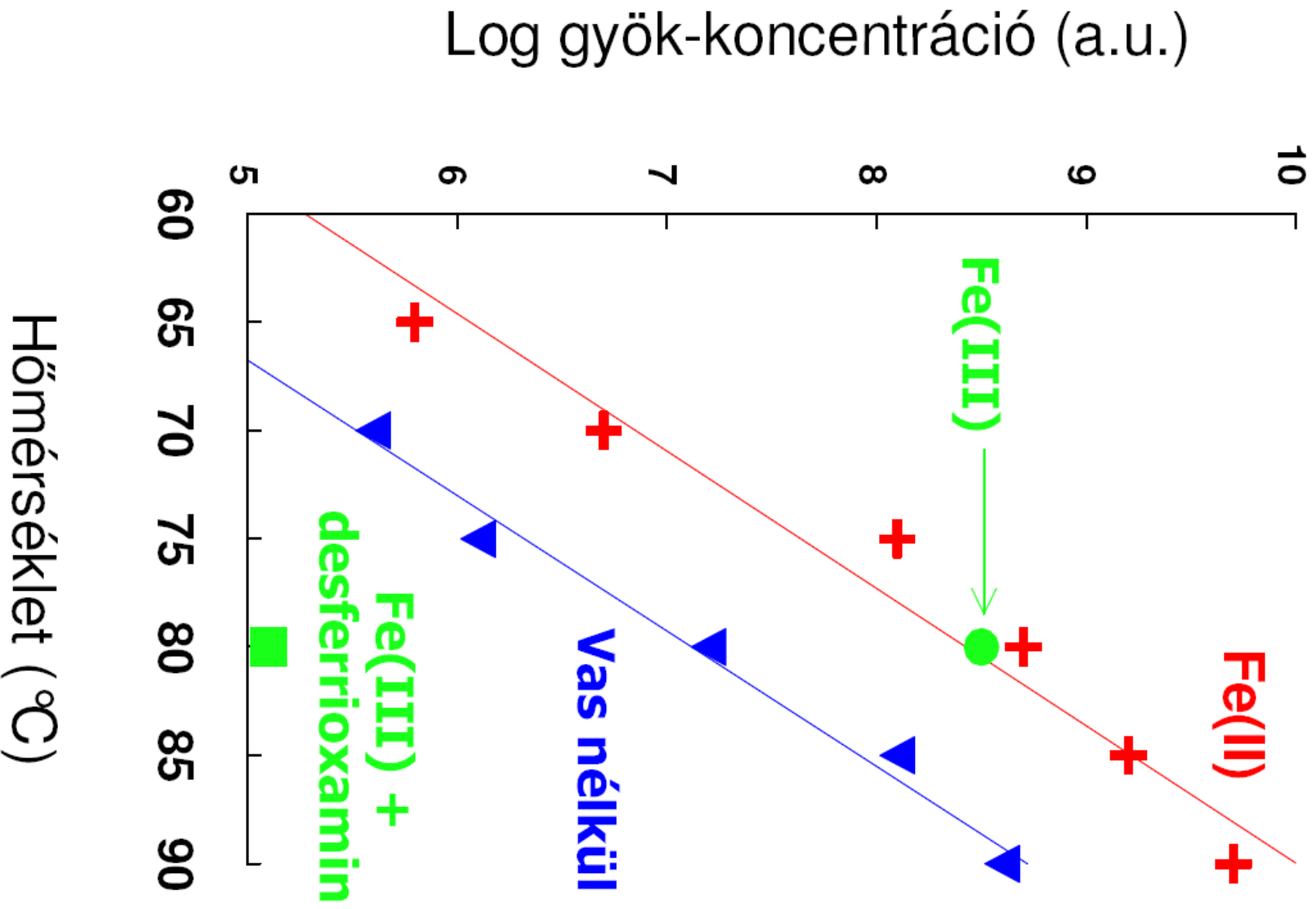


1000 mM arginin

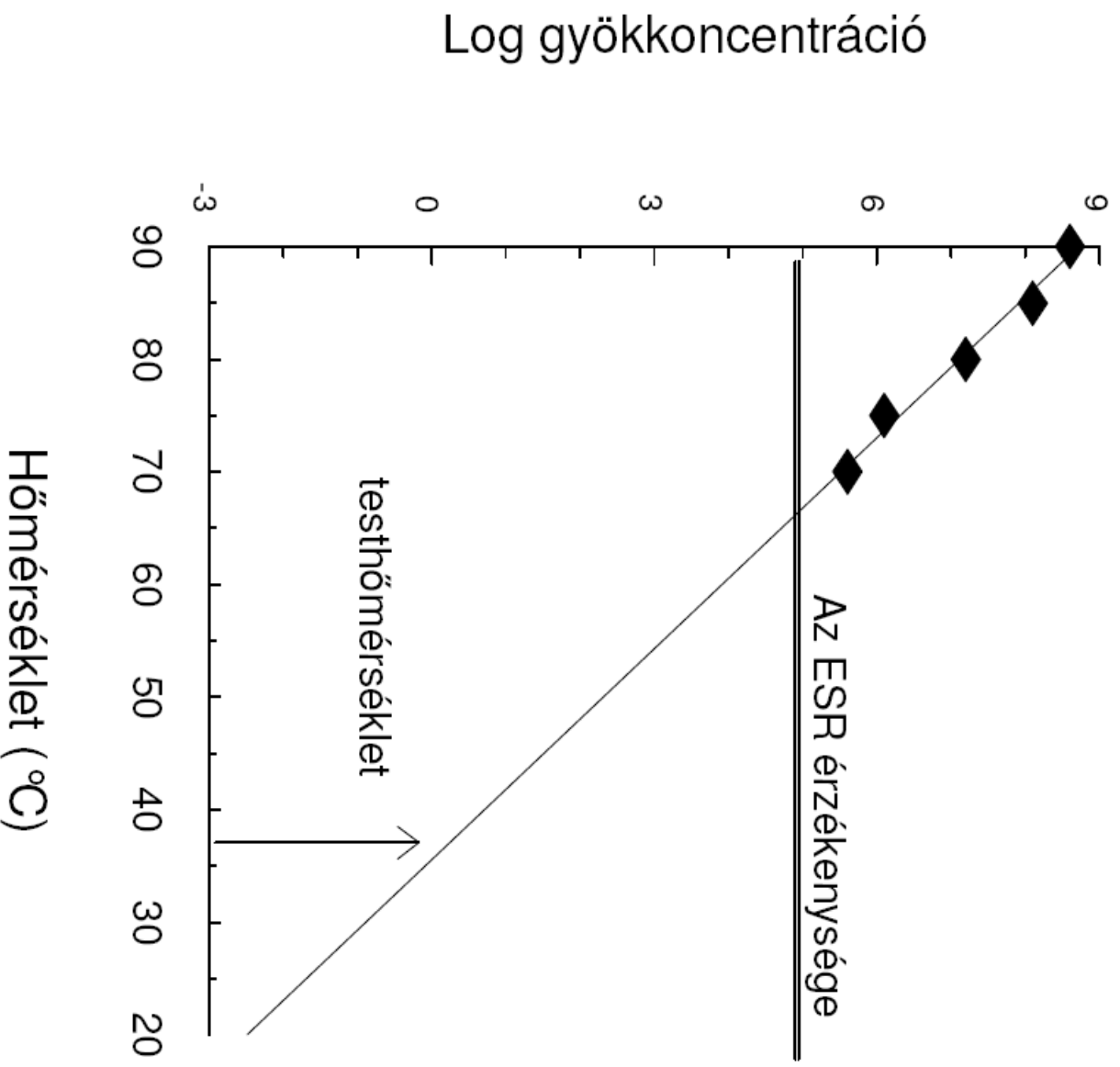


1000 mM glükóz + 1000 mM arginin

27. ábra: A vas katalizáló hatása az arginin-glükóz reakcióra

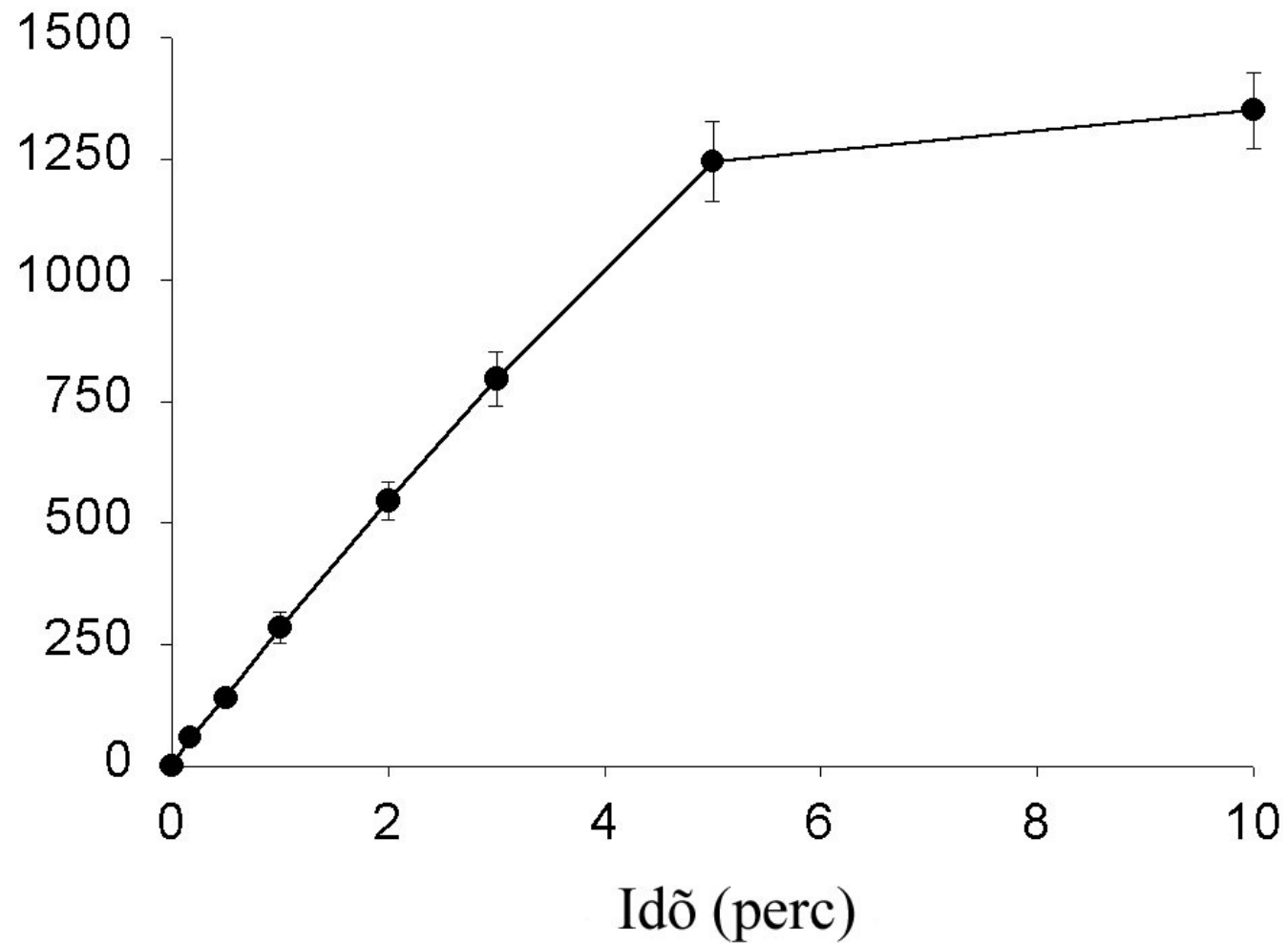


28. ábra: ESR metodikával az arginin és glükóz reakciója során keletkezett szabad gyökököt nem lehet kimutatni testhőmérsékleten.

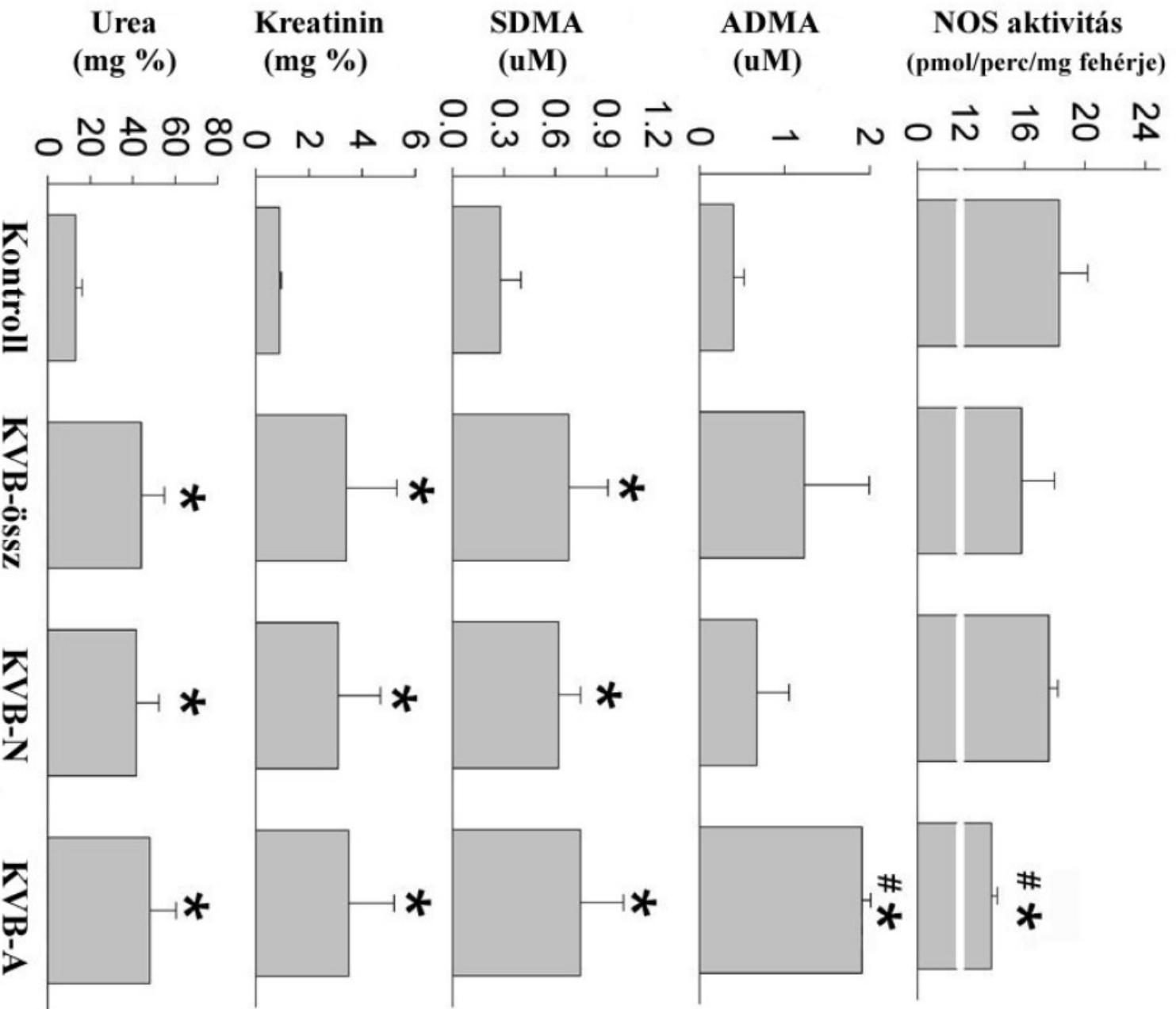


29. ábra: L-arg transzport időfüggése HDMVEC-ben

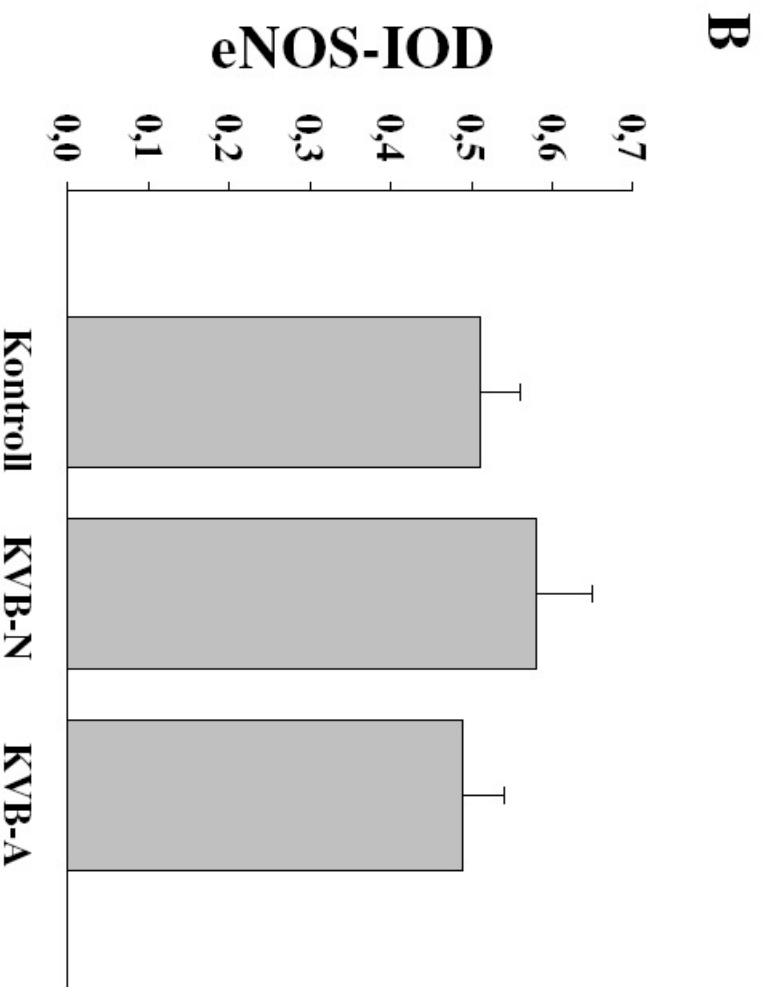
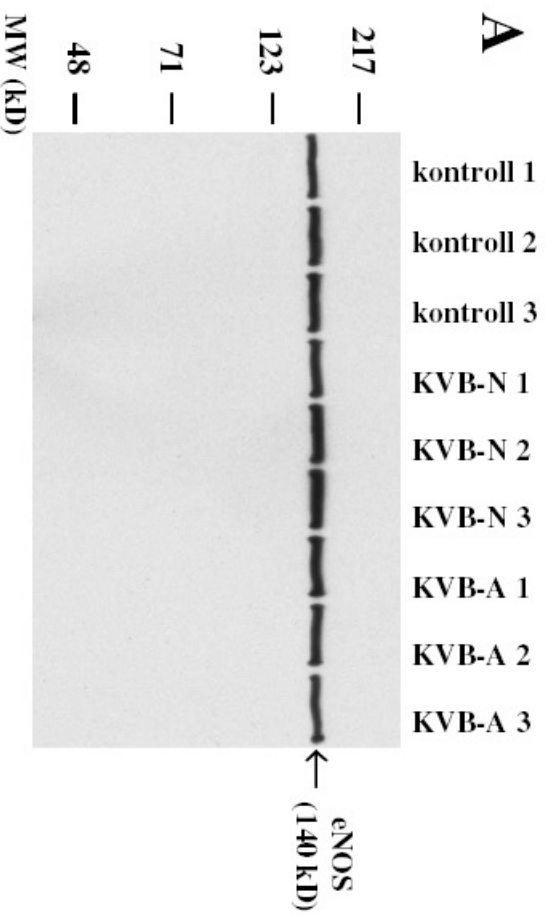
L-arginin transzport
(pmol/perc/mg fehérje)



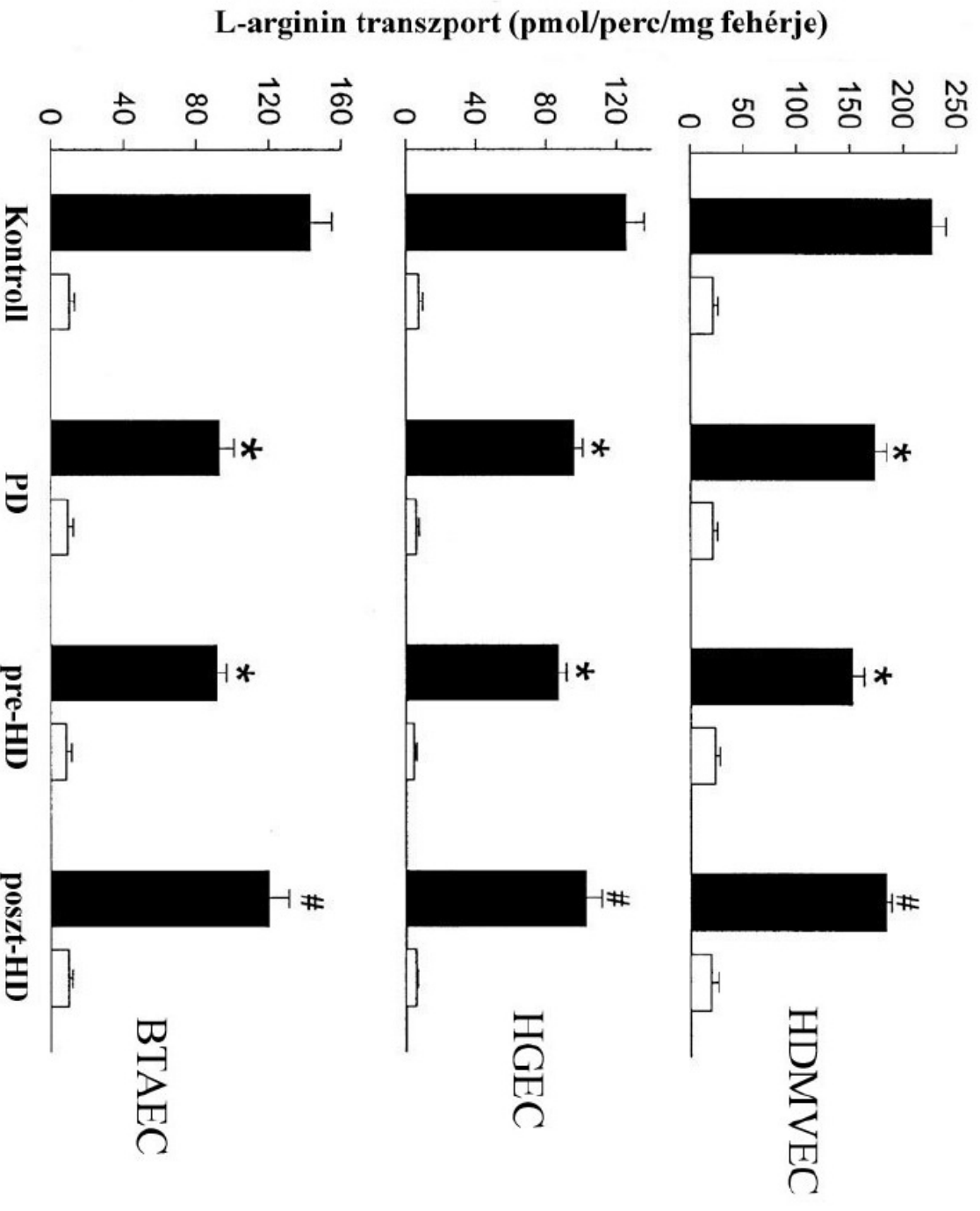
30. ábra: Összefüggés a plazma HDMVEC sejtek NOS aktivitását befolyásoló hatása, a plazma ADMA, SDMA, kreatinin és urea szintek között kontrollokban és KVB-ben szenvedőkben. KVB-N: normál, KVB-A: alacsony NOS-aktivitású csoport. *p<0.05 kontrollokhoz viszonyítva, #p<0.05 a normál NOS-aktivitású csoporthoz viszonyítva.



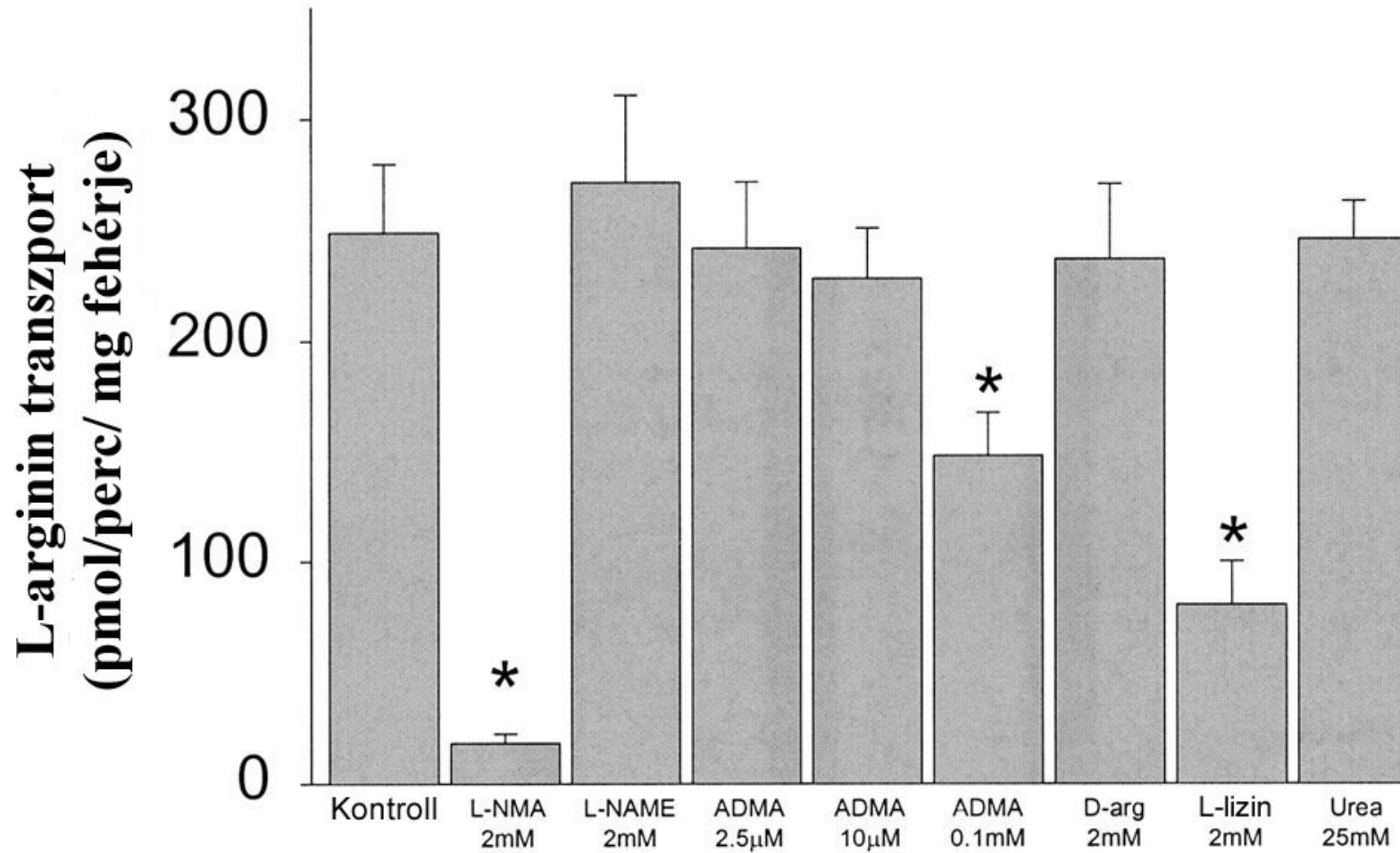
31. ábra: HDMVEC Western blot - az eNOS protein mennyiségének változása 6 óra, 20%-os plazmával történő inkubáció után, kontrollokból és krónikus vesebetegekből származó, normál (KVB-N) és alacsony (KVB-A) NOS aktivitást kiváltó plazmával. (A) Az egyes kísérletekhez tartozó sejttizátumok eNOS tartalma. (B) Az össz eNOS-denzitás (IOD) a különböző csoportokban (átlag \pm SE).



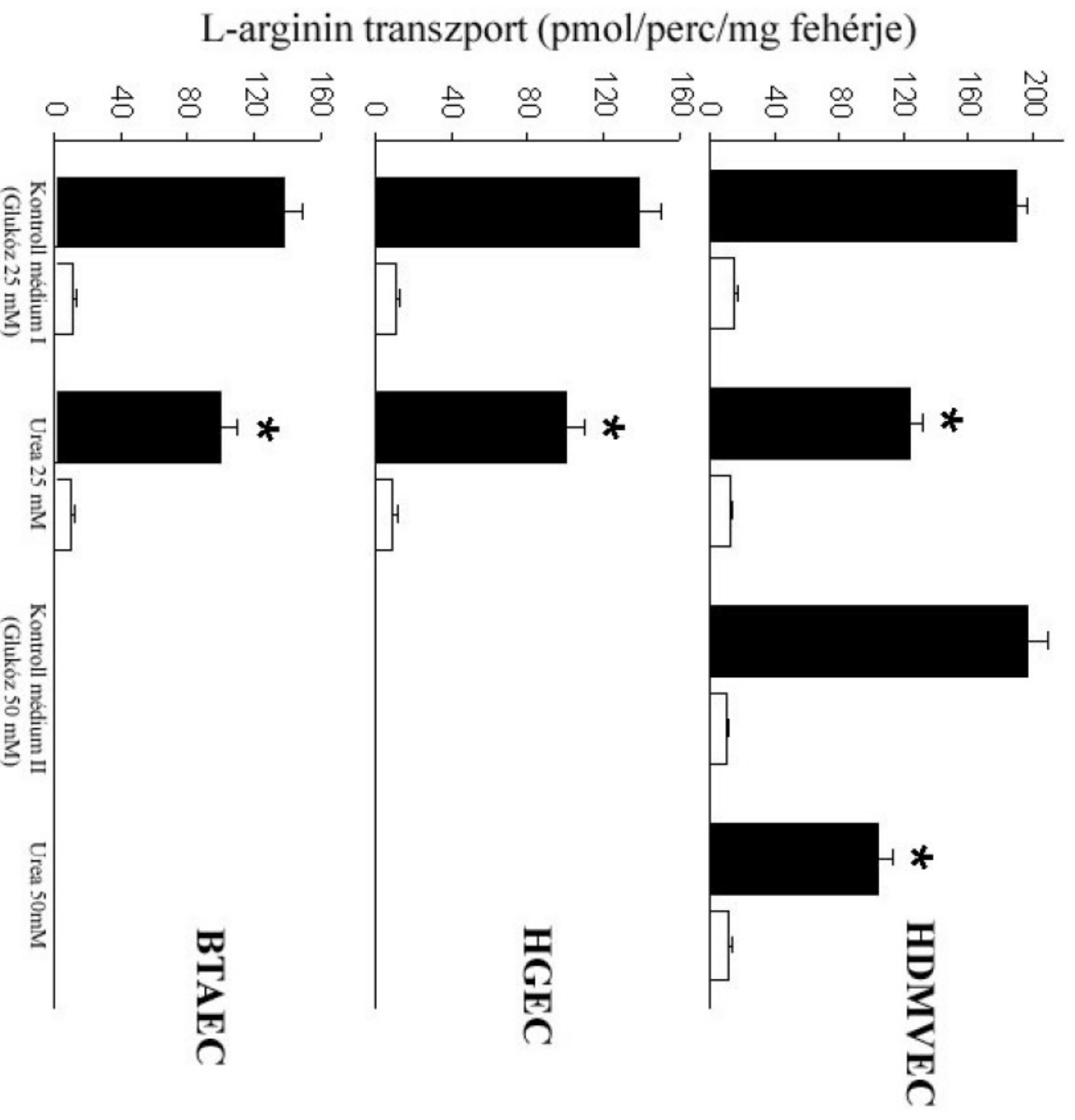
32. ábra: Kontrollokból és urémiásokból (PD – peritonealisan dializált, HD – hemodializált) származó plazma 20%-os oldatának hatása 6 órás inkubáció után az L-arg transzportra HDMVEC, HGEC, BTAEC sejtekben. Az üres oszlopok az L-NMA (5 mM) jelenlétében mért értékekeket mutatják. (* $p < 0.01$ vs kontroll, # $p < 0.05$ vs pre-HD)



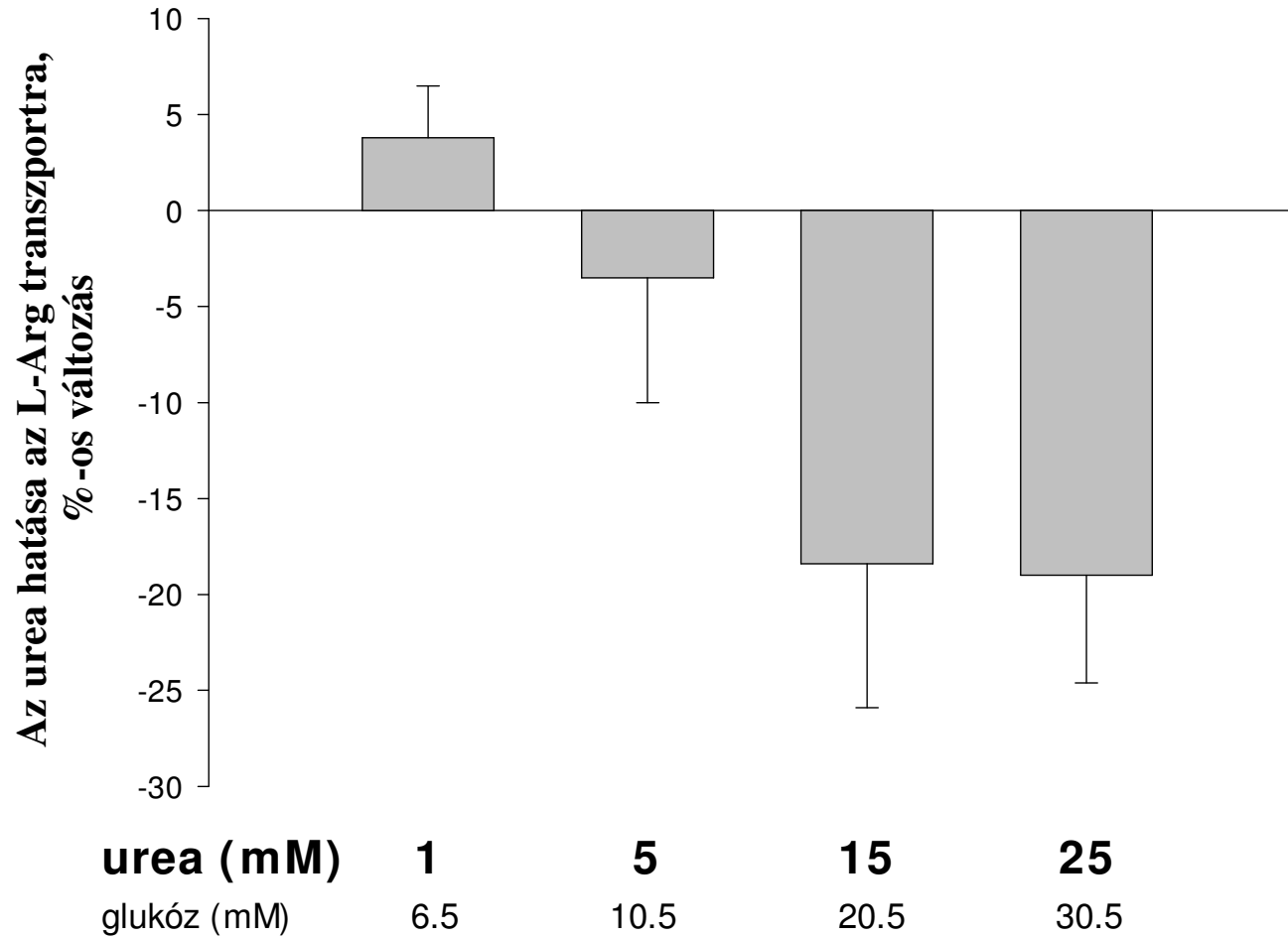
33. ábra: Különböző anyagok kompetíciója akut inkubáció során az L-arg transzporterekért HDMVEC sejtekben (*p<0.05 vs kontroll)



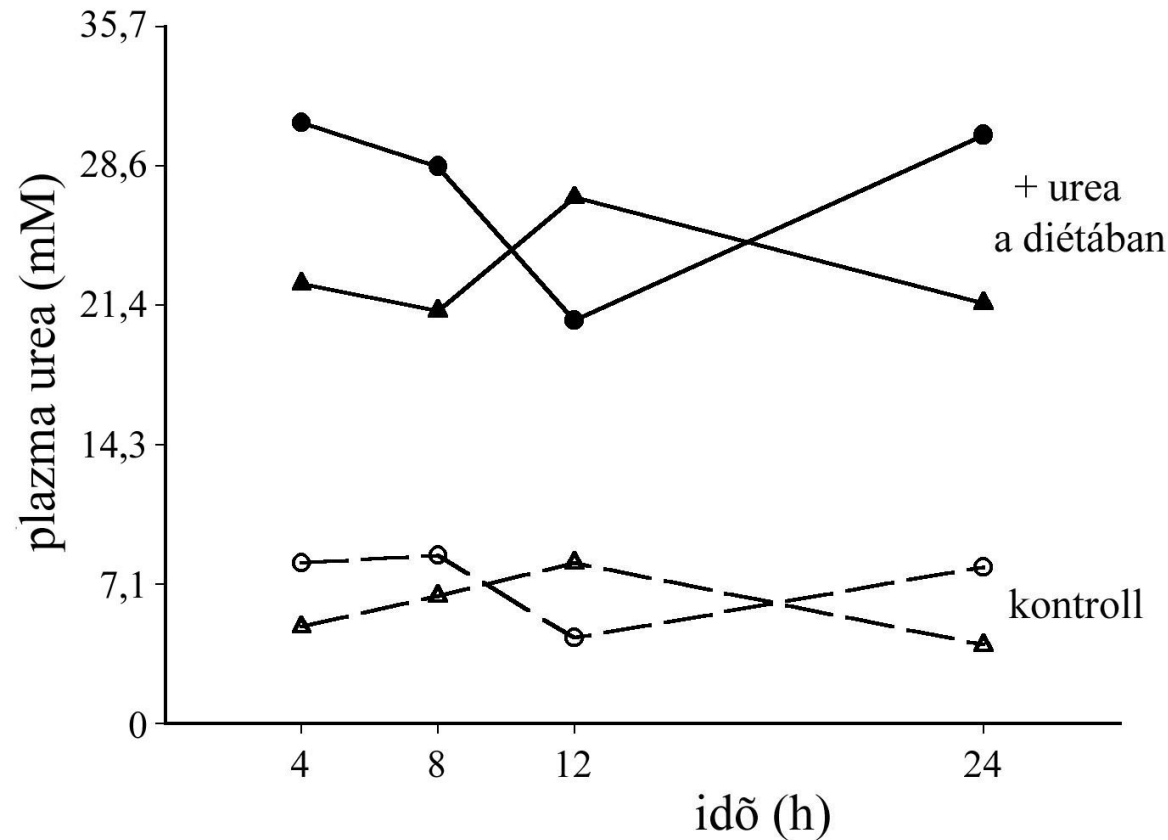
34. ábra: Urea (25 és 50 mM) és ozmotikus kontrollja (glükóz, 25 mM és 50 mM) hatása endotélsejtek (HDMVEC, HGEC, BTAEC) L-arg transzportjára 6 órás inkubáció után (*p<0.05 vs kontroll). Az üres oszlopok 5 mM L-NMA-val történt koinkubáció eredményét mutatják.



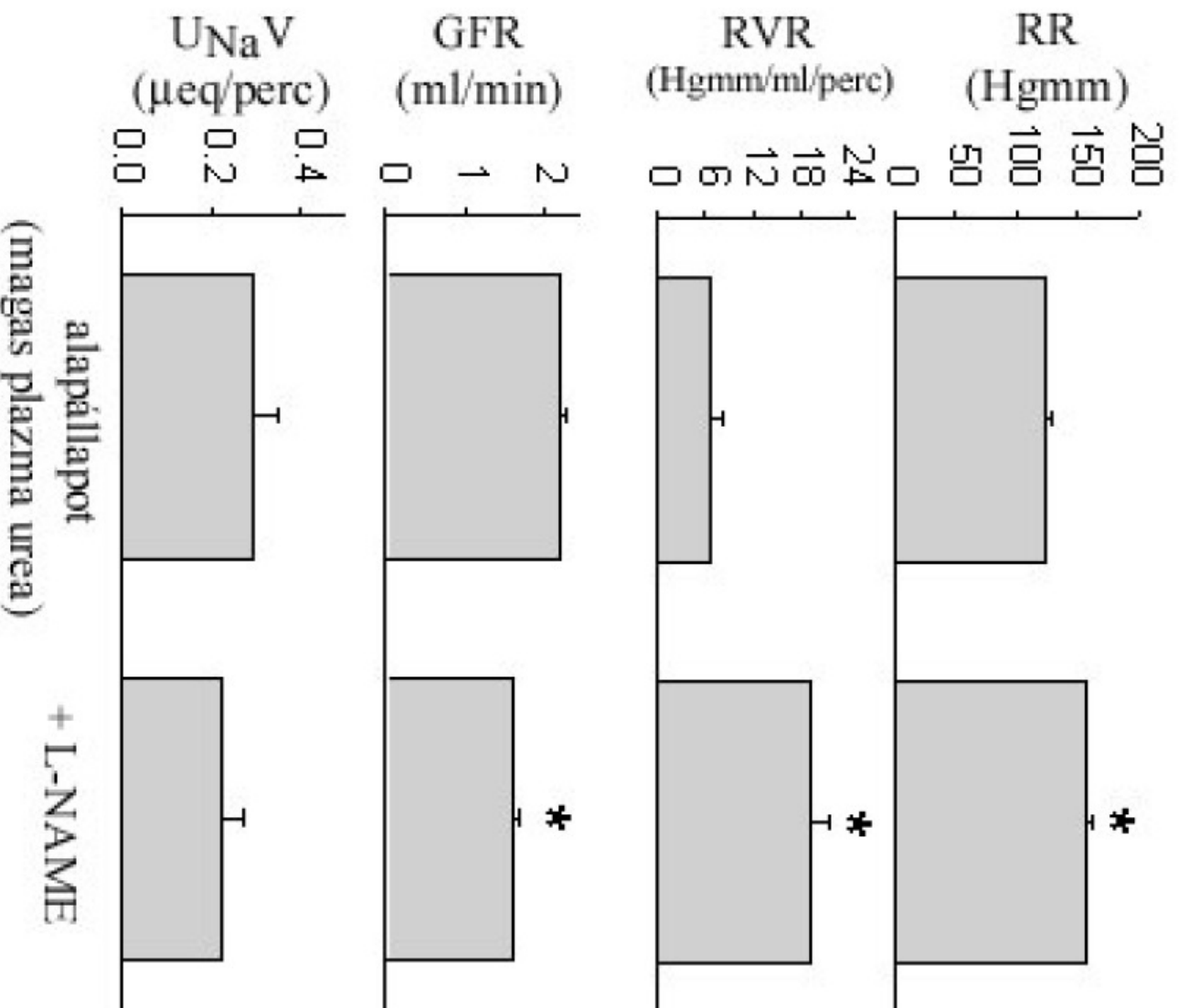
35. ábra: Különböző koncentrációjú urea hatása az L-arg transzportra BTAEC-ben



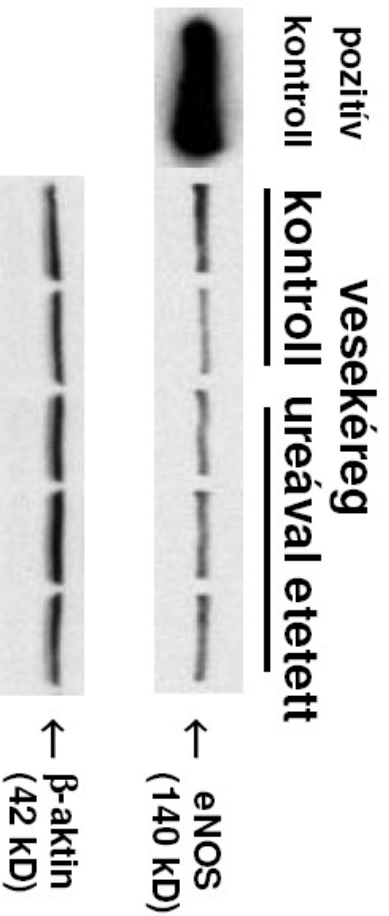
37. ábra: Plazma urea szintek 2 egészséges (üres szimbólumok, szaggatott vonalak, n=2) és 3 napig 30% ureával kiegészített táppal etetett 2 patkányban (telt szimbólumok, folytonos vonalak), 24h-án keresztül, 6h-ás időközökben levett vérmintákból.

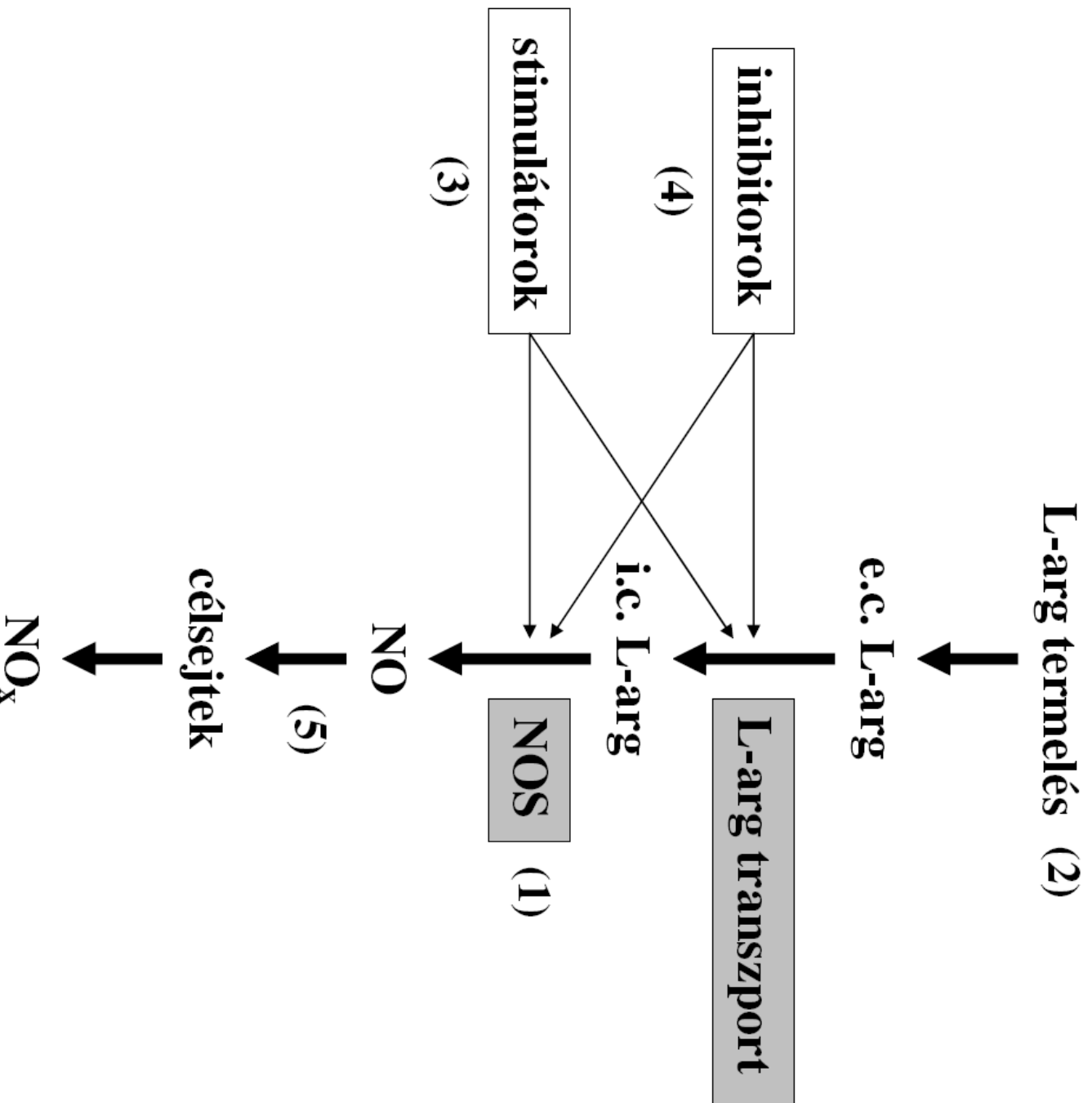


38. ábra: Akut szisztémás NOS gátlás (L-NAME) hatása a vérnyomásra (RR, felső panel), renális vaszkuláris rezisztenciára (RVR, második panel), glomeruláris filtrációs rátára (GFR, harmadik panel) és a vizelet nátrium ürítésére (U_{NaV} , alsó panel) 7 napig ureával etetett állatokban (n=6). *: $P < 0.05$.



39. ábra: Reprezentatív Western blot - eNOS fehérje pozitív kontrollban (75 µg fehérje BTAEFC lizátumból); 100 µg fehérje patkány vesekéreg homogenizátumból (2 kontroll állat, 3 ureával etetett állat). Ugyanezen a membránon elvégeztük a β-aktin kimutatást is, ami az egyforma össz-fehérje felvitelt tükrözi.





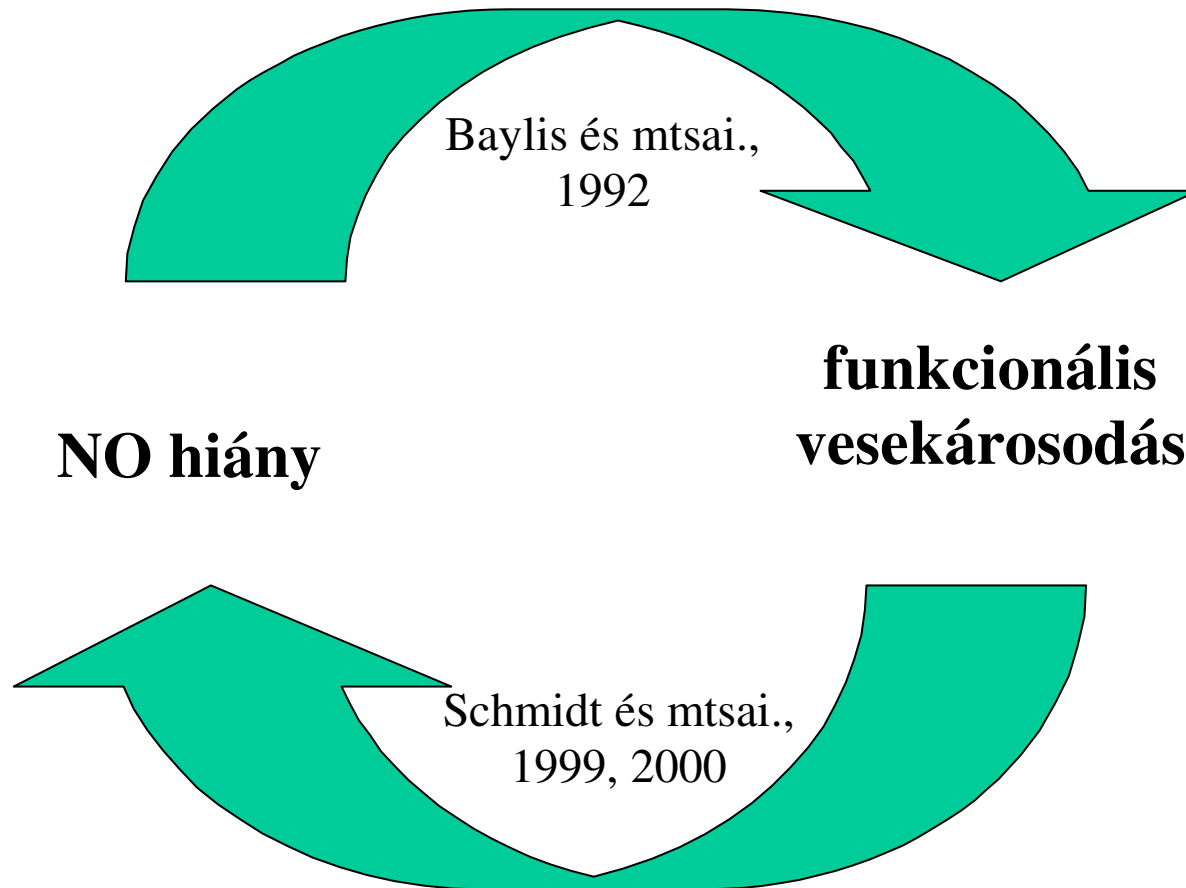
40. ábra:

Az L-arg – NO rendszer károsodása urémiában

↓ L-arg – NO tengely

1. szisztémás hipertónia, ateroszklerózis (4,5 is)
2. csökkent vesetömeg – csökkent L-arg termelés
3. emelkedett citokin-termelés
4. L-arg analógok
5. az NO fizikai, kémiai állapotának megváltozása

41. ábra: A krónikus vesebetegséghez és hipertóniához vezető mechanizmus



plazma	koncentráció	irodalmi adatok
L-arginin	60-120 μM 74 \pm 5 μM 125 \pm 5,5 μM 80-100 μM 68 \pm 10 μM 81 \pm 13 μM	21 93 197 248 263 264
L-citrullin	50 \pm 8,6 μM 37 \pm 3 μM 30-40 μM 30 \pm 3 μM 26 \pm 2 μM	197 216 248 263 264
L-ornitin	111 \pm 7 μM 65 \pm 3 μM	197 216
N ^G -hydroxy-L-arginine (NOHA)	9 μM	314
NO (szabad)	~3 nM	277
ADMA	0,41 \pm 0,09 μM 0,36 \pm 0,08 μM 0,73 \pm 0,06 μM 1 \pm 0,1 μM 0,5-1 μM 1,15 \pm 0,13 μM 0,4 \pm 0,1 μM 0,4 \pm 0,08 μM	7 8 93 145 169 248 263 264
SDMA	0,379 \pm 0,104 μM 0,37 \pm 0,11 μM 0,5 \pm 0,04 μM 0,8 \pm 0,1 μM 0,14 \pm 0,04 μM 0,12 \pm 0,02 μM	7 8 93 145 263 264
L-NMMA	nem detektálható	263
agmatin	0.29 \pm 0.04 μM	112

1. Táblázat: Néhány fontosabb L-arg metabolit normál szintje emberi plazmában

vizelet	koncentráció	irodalmi adatok
L-arginin	19-54 $\mu\text{mol/g}$ kreatinin	135
	$18,3 \pm 9,35 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$	188
L-ornitin	8-26 $\mu\text{mol/g}$ kreatinin	135
ADMA	$41,5 \pm 10,9 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$	7
	27-64 $\mu\text{mol/g}$ kreatinin	135
	$0,41 \pm 0,09 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$	188
	$13,5 \pm 3,1 \text{ mg}/24 \text{ h}$	248
SDMA	$38,9 \pm 9,75 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$	7
	31-63 $\mu\text{mol/g}$ kreatinin	135
	$0,38 \pm 0,1 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$	188

2. Táblázat: Néhány fontosabb L-arg metabolit normál szintje emberi vizeletben

3. táblázat:

A vérnyomás és a vesefunkciós paraméterek KVB-ben szenvedő betegekben és kontrollokban

	vérnyomás (Hgmm)		urea (mM)	kreatinin (μ M)	kreatinin klórenszenz (ml/perc/ m^2)
	Szisztolés	Diasztolés			
KVB (n=11)	148 \pm 8*	80 \pm 3	16.5 \pm 0.4*	352 \pm 132*	33 \pm 5*
Kontroll (n=5)	117 \pm 6	72 \pm 4	3.6 \pm 1.1	70 \pm 18	119 \pm 22*

* kontrolltól szignifikánsan különbözik

KVB = krónikus vesebetegségben szenvedők

4. táblázat: Krónikus vesebetegségben szenvedők és kontrollok plazmájának hatása HDMVEC sejtek NOS aktivitására

NOS aktivitás (pmol/perc/mg fehérje)	
alap	dexametazon után

Kontroll átlag: 18.3±1.9 18.4±2.1

A KVB-ben szenvedők plazmájának hatása

(individuális értékek):

1 (Wegener g.)	13.2±0.9*	13.8±1.1*
2 (DM)	18.5±0.8	19.0±1.3
3 (DM)	12.6±1.8*	14.1±1.1*
4 (CIN)	16.8±1.9	15.6±1.5
5 (GN)	18.2±1.0	18.7±0.9
6 (IgA)	15.1±0.5*	14.3±1.1*
7 (DM)	19.5±1.3	19.0±2.5
8 (GN)	15.9±2.5	16.1±2.3
9 (FSGS)	13.9±1.2*	14.1±1.1*
10 (DM)	14.0±1.3*	13.9±1.4*
11 (OBN)	16.4±1.9	15.5±2.1

(* Az alacsony NOS aktivitású csoportba tartozók dőlt betűvel szedve.)

A KVB-ben szenvedők plazmájának hatása (átlagok):

Össz beteg: 15.8±1.4 15.8±1.5

Alacsony NOS: 14.0±1.3 13.9±1.4

Normális NOS: 17.6±1.6 17.3±1.8

**5. táblázat: Urémiás betegek néhány klinikai és biokémiai jellemzője
(akiknek plazmáját a sejtek inkubációjához használtuk)**

	Vérnyomás (Hgmm) szisztolés diasztolés	KT/V	Plazma urea (mM)	Plazma kreatinin (μ M)	Antihipertenzív gyógyszerelés\$
Kontroll (n=5)	117 \pm 6 72 \pm 4	-	4 \pm 1	70 \pm 18	Nem volt
PD (n=6)	127 \pm 4 74 \pm 5	-	15 \pm 2*	889 \pm 282*	BB, ACEI, D
HD pre- (n=5) poszt-	136 \pm 8* 69 \pm 3	1.5 \pm 0.1	26 \pm 3* 11 \pm 1*#	898 \pm 123* 282 \pm 35*#	BB, ACEI, D

\$: Antihipertenzív gyógyszerek: BB=beta-blokkoló; ACEI=angiotenzin konvertáló enzim gátló; D=diuretikum.

*p<0.05 vs kontroll, #p<0.05 pre- vs poszt-hemodialízis.

6. táblázat: Urémiásokban előforduló koncentrációjú ureamennyiség hatása a NOS aktivitásra (pmol L-arg konverziója L-citrullinná/perc/mg fehérje), az L-arg transzportra (pmol L-arg transzportja/perc/mg fehérje) és az intracelluláris L-arg koncentrációra (μM; számolva μmol/g össz sejtfehérje és 1 mg sejtfehérje=6 μl intracelluláris volumen /Zinc et al., 1993/ felhasználásával). *p<0.05 vs kontroll. A zárójelben a 2 mM L-NMA hozzáadása utáni értékeket tüntettük fel.

Sejttípus	Kontroll	25 mM urea	Mérés
	(25 mM glukóz)		
	6 órás inkubáció után		
HDMVEC	13.4±1.9 (1.6±0.2)	13.6±1.8 (1.9±0.3)	NOS aktivitás
HGEC	16.4±1.1 (2.4±0.7)	14.9±1.7 (2.6±0.7)	
BTAEC	20.3±2.1 (2.9±1.0)	21.5±2.4 (2.8±0.8)	
BTAEC	743±35	717±28	L-arg koncentráció
	Kontroll	25 mM urea	
	(25 mM mannitol)		
	7 nap inkubáció után		
HDMVEC	228±27 (20±8)	148±17 (19±7)*	L-arg transzport
HDMVEC	17.4±1.1 (2.1±0.4)	13.1±0.5 (1.8±0.3)*	NOS aktivitás
BTAEC	1,136±50	1,326±52 *	L-arg koncentráció

7. táblázat: Kontroll (n=6) és 7 napig ureával etetett patkányok vizelettel ürített NO₂ + NO₃ (=NO_X; U_{NOXV}) mennyisége

és a teljes ürített fehérjemennyiség (UpV) gyűjtött vizeletből. Mértük továbbá a plazma CN-t, az átlagvérnyomást, a renalis vascularis resistenciát (RVR), renalis plazma áramlást (RPF), glomerularis filtrációs rátát (GFR), vizelettel ürített Na mennyiségét (U_{NaV}) és vizelet osmolalitást (Uosm) az akut vesefunkciós vizsgálatok során.

NS = nem szignifikáns

	U _{NOXV}	UpV	Plazma CN	RR	RVR	RPF	GFR	Uosm	U _{NaV}
	μmol/24h	mg/24h	MM	mm Hg	mm Hg/(ml/min)	ml/min	ml/min	mosm/L	μmol/min
Kontroll	6.9±1.1	37±11	5.4±0.4	118±3	8.4±1.6	9±1	2.3±0.2	604±75	1.8±0.5
+ Urea	10.4±0.7	88±15	24.6±1.4	123±6	6.8±1.6	11±1	2.5±0.2	1198±83	0.3±0.1
P érték	<0.01	<0.01	<0.001	NS	NS	NS	NS	<0.001	<0.05

8. táblázat: In vitro mérések történtek a vesekéregben (kontroll és 7 napig ureával etetett patkányokban (n=4 mindkét csoportban): vizsgáltuk a szöveti L-arginin koncentrációt [L-arg], az endothelialis és neuronális NOS (eNOS és nNOS) fehérjék mennyiségét (β -aktinhoz viszonyítva, integrált optikai denzitás = IOD egységekben), és a NOS aktivitást (pmol citrullin konvertálva /min/mg fehérje) a szolubilis frakcióban. A zárójelek között feltüntetett értékek a NOS aktivitás %-os gátlását jelzik NOS-inhibitorok jelenlétében. NS= nem szignifikáns.

	[L-arg], nmol/ mg fehérje	eNOS/ β -aktin, IOD	nNOS/ β -aktin, IOD	NOS aktivitás pmol cit/min/mg fehérje
Kontroll	14.3 \pm 0.6	1.5 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	0.82 \pm 0.13 (89 \pm 1)
+ Urea	13.1 \pm 0.5	1.2 \pm 0.4	0.2 \pm 0.1	0.84 \pm 0.11 (86 \pm 2)
P érték	NS	NS	NS	NS

9. táblázat: A vizelettel ürített NOx, cGMP és ET mennyisége

IgA NP-ás betegekben és egészséges kontrollokban,

24 órás sterilen gyűjtött vizeletből

	vizelet NOx (mmol/die)	vizelet cGMP (nmol/die)	vizelet endothelin (pmol/die)
IgA NP	0,986±0,054 (n=32)	512±61 (n=20)	20,65±0,59 (n=32)
Kontroll	1,112±0,060 (n=20)	629±47 (n=20)	18,43±1,27 (n=20)
	NS	NS	NS