$dc_{360_{11}}$

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

OXIDATÍV- ÉS KARBONIL STRESSZ DIABETES MELLITUSBAN ÉS VESEBETEGSÉGBEN

Wittmann István

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

Pécs, 2013.

$dc_{360_{12}}$

2. Eredeti tudományos felismerések73. Összefoglalás124. Bevezetés154.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői154.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői154.1.1. Az inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában154.1.2. Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban234.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. Diabetes mellitus oxidatív strassz és hypertonia23
3.Összefoglalás124.Bevezetés154.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői154.1. A 2 inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában154.1.1. Az inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában154.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban234.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabates mellitus oridatív straszz és hypertonia23
4.Bevezetés154.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői154.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői154.1.1. Az inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában15és progressziójában154.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5 L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői154.1.1. Az inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában15és progressziójában154.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban234.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.1.1. Az inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában15és progressziójában154.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív straszz és hupertonia23
és progressziójában154.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között174.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stessz és hypertonia23
4.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív strassz és hypertonia23
illetve a hypertonia184.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.2. A szabad gyökök jellemzői194.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.2.1. A vízoldékony szabad gyökök204.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök204.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök214.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus oxidatív stressz és hypertonia23
4.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben224.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus, oxidatív stressz és hypertonia23
4.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban224.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5. L Diabetes mellitus, oxidatív stressz és hypertonia23
4.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban234.5.1 Diabetes mellitus oridatív stressz és hypertonia23
4.5.1 Diabetes mellitus, oridatív stress és hunertonia 23
7.5.1. Diabetes metitias, oxidativ stress2 es hyperionia 25
4.5.2. Diabetes mellitus, vasanyagcserezavar, oxidatív stressz
és hypertonia 24
4.5.3. Diabetes mellitus, renin-angiotenzin-rendszer, oxidatív stressz
és hypertonia 25
4.6. Antioxidánsok25
4.7. A nem enzimatikus glikáció 26
4.7.1. A nem enzimatikus glikáció definíciója 26
4.7.2. Előzmények 26
4.7.3. A nem enzimatikus glikáció kémiája27
4.7.4. A hemoglobin glikációja 28
4.7.5. A glikációs végtermékek mérésére használatos módszerek 28
4.7.6. A karbonil stressz 29
4.7.7. A nem enzimatikus glikacio pathophysiologiaja 29
4.7.7.1. A glikációs végtermekek szervezetbe tortenő bevilete 50
4.7.7.2. A glikációs véglermékek kelelkezese ű szervezelően 51 4.7.7.3. A glikációs véglermékek felvátala a saitakba (AGE racantorok) 31
4.7.7.5. A glikációs végtermékek Jelvelele a Sejlekbe (AGE-receptorok) 51 4.7.7.4. A glikációs végtermékek Jehontása 32
4775 A olikációs végtermékek eliminációja 33
47.7.5 1. A glikációs végtermékek szöveti lerakódása 33
4.7.7.5.2. A glikációs végtermékek veseeliminációja vesekárosodáshoz vezet 33
4.8. Vesebetegség és oxidatív stressz 34
49 A proteinuria
4.9.1. A proteinuriát megakadályozó vesestruktúrák 35

$dc_{360_{1^{3}1}}$

4.9.1.1. Endotél és glomerulus bazálmembrán	35
4.9.1.2. Podocyta és nephrin	36
4.9.2. Proteinuria és nephronvesztés	36
4.10. Dohányzás és oxidatív stressz	37
5. VIZSGÁLATOK 1: Az oxidatív stressz, a glikáció és a karbonil stressz diabetes	nellitusban,
vesebetegségben és dohányzásban	38
5.1. Vizsgálatok diabetes mellitusban	39
5.1.1. Bevezetés	39
5.1.2. Betegek és módszerek	39
5.1.3. Eredmények	42
5.2. A nem enzimatikus glikáció megfordíthatóságának genetikája	46
5.2.1. Bevezetés	46
5.2.2. Betegek és módszerek	47
5.2.3. Eredmények	48
5.3. Inzulin-rezisztenciában a nem enzimatikus glikáció növeli a vesében a renin	
pozitivitást	52
5.3.1. Bevezetés	52
5.3.2.Módszerek	52
5.3.3.Eredmények	57
5.4. Vizsgálatok diabeteses nephropathiában (O-glikoziláció)	67
5.4.1. Bevezetés	67
5.4.2. Betegek és módszerek	71
5.4.3. Eredmények	72
5.5. Vizsgálatok IgA nephropathiában	74
5.5.1. Bevezetés	74
5.5.2. Betegek és módszerek	75
5.5.3. Eredmények	76
5.6. Albumin vizeletürítésének HPLC-vel történő mérése.	78
5.6.1. A vizeletalbumin oxidatív és karbonil stressz általi módosítása	78
5.6.1.1. Bevezetés	78
5.6.1.2. Betegek és módszerek	79
5.6.1.3. Eredmények	82
5.6.2. Albumin vizeletürítésének HPLC-vel történő mérése. A tiol-csoportok szerepe.	87
5.6.2.1. Bevezetés	87
5.6.2.2. Betegek és módszerek	87
5.6.2.3. Eredmények	89
5.7. Glomeruláris típusú haematuria modellezése karbonil és oxidatív stresszel	94
5.7.1. Glomeruláris típusú haematuria modellezése	94
5.7.1.1. Bevezetés	94
5.7.1.2. Módszerek	94
5.7.1.3. Eredmények	95

5.7.2. A metilglioxál oxidatív stresszt vált ki vörösvértestben	100
5.7.2.1. Bevezetés	100
5.7.2.2. Módszerek	101
5723 Eredmények	102
	102
58 Vizsgálatok urémiás, hemodializált betegekben	114
5 8 1 Revezetés	114
5.8.7 Betregek és módszerek	114
5.8.3 Fredmények	115
5.6.5. Ereamenyek	115
5.9. Dohányzás, oxidatív- és karbonil stressz in vitro és in vivo	120
	100
5.9.1. Dohanyjust hatasa a cGMP-termelesre endotelsejtekben	120
5.9.1.1. Bevezetes	120
5.9.1.2. Módszerek	120
5.9.1.3. Eredmények	122
	105
5.9.2. A dohanyfust gatolja a bradikinin kivaltotta kalciumbearamlast az endotelsejtekbe	125
5.9.2.1. Bevezetés	125
5.9.2.2. Módszerek	126
5.9.2.3. Eredmények	128
502 A dahám füst mom áltostatia az andotáliális nitvosán monovid szintáz fossfovilációiát:	a protoin
5.9.5. A uonunyjusi megvuitožiuju už enuoletiutis nitrogen-monožiu sziniuž joszjor tučiojut.	<i>u protetti</i>
5 0 2 1 Provezetés	134
5.0.2.2 Méda-and	134
5.9.5.2. Moaszerek	134
5.9.3.3. Ereamenyek	135
594 Dohányzás okozta renális artéria relaxáció	143
5941 Revezetés	143
594? Retegek és módszerek	144
5.9.4.3 Fredmények	145
5.7.4.5. Er cumenyek	145
59.5 Lehetséges összefüggés a dohányzás és a Kimmelstiel-Wilson-lézió között	152
59.51 Bevezetés	1.52
5957 Betegek és módszerek	152
5953 Eredmények	153
5.7.0.5. Li cumenyer	100
5.10. Megbeszélés	156
5.10.1. Diabetes mellitus	156
5 10 2 A nem enzimatikus glikáció megfordíthatósága	157
5 10 3 A nem enzimatikus glikáció növeli vesében a renin pozitivitást	159
5 10 4 Diabeteses nenhronathia és O-glikoziláció	159
5 10 5 JoA nenhronathia	160
5 106 Vizeletalhumin-ürítés HPI C-mérése	161
5.10.7 Glomoruláris haomaturia modellozáse	164
5.10.8 Vágállapotú vasaolágtalonság	165
5.10.0. Dohámzás	105
J.10.9. Donunyzas	10/

6. VIZSGÁLATOK 2: Egy bizonyos szabad gyök, a hidroxil szabad gyök által kiváltott oxidatív stressz diabetes mellitusban és vesebetegségekben 173

6.1. Aminosavak oxidációs termékei

 $dc_{360_{151}}$

6.2. Oxidált fenilalanin-származékok és vese 6.2.1. Bevezetés	174 174
6.2.2. Betegek és módszerek 6.2.3. Eredmények	175 177
6.3. Az oxidált fenilalanin-származékok és a katarakta	179
6.3.1. Bevezetés	179
6.3.2. Betegek és módszerek	180
6.3.3. Eredmények	181
6.4. Az oxidált fenilalanin-származékok az inzulin-rezisztencia lehetséges okai	185
6.4.1. Az orto- és meta-tirozin inzulin-rezisztenciát kelt zsírsejtekben	185
6.4.1.1. Bevezetés	185
6.4.1.2. Módszerek	186
6.4.1.3. Eredmények	187
6.4.2. Az orto-tirozin inzulin-rezisztenciát kelt az érfalban	193
6.4.2.1. Bevezetés	193
6.4.2.2. Módszerek	193
6.4.2.3. Eredmények	194
6.5.Megbeszélés	202
7. VIZSGÁLATOK 3: Szabad gyökök szerepe az anyagcsere szabályozásában és az	
érfalmeszesedésben	209
7.1. Az oxidatív stressz egyszerre vezethet inzulinrezisztenciához és	
atherosclerosishoz	209
7.2. A szabadgyök-túltermelés gátolhatja a hepatikus glukózkiáramlást	209
7.2.1. Bevezetés	209
7.2.2. Módszerek	210
7.2.3 Eredmények	211
7.3. Az antioxidáns rezveratrol anyagcserehatása	215
7.3.1. Bevezetés	215
7.3.2. Betegek és módszerek	215
7.3.3. Eredmények	218
7.4. Az endogén ouabain szérumszintje összefügg a hipertoniás vesebetegek cardio	vasculáris
állapotával. Az orto-tirozin lehetséges szerepe	222
7.4.1. Bevezetés	222
7.4.2. Betegek és módszerek	224
7.4.3. Eredmények	225
7.5. Megbeszélés	228
8.Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke	231
9.Irodalomjegyzék Jelmagyarázat: Az értekezés alapiául szolgáló közlemények listáiában római	236 számozást

Jelmagyarázat: Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában római számozást alkalmaztunk, amelyeket a hivatkozott szövegrészben döntött és félkövér betűkkel jelöltünk.

1.Köszönetnyilvánítások

Megköszönöm családom támogató türelmét, amivel fogadták és fogadják azt, hogy több mint 25 éve a tudományos tevékenységre olyan sok időt fordítok.

Köszönet tanáraimnak és azoknak, akikkel együtt dolgozhattam és dolgozhatok, időrendi sorrendben:

Köszönöm **Dr. Puppi András** tanár úrnak, hogy bevezetett a tudományos munkába, megmutatta a sejtek redox-regulációjának szépségeit és megtanított az alapkutatás elveire.

Köszönöm **Dr. Jávor Tibor** (†) professzor úrnak, hogy bevezetett a beteggyógyítás és a klinikai kutatás rejtelmeibe és megmutatta a szabadgyökök jelentőségét a betegségek kifejlődésében.

Köszönöm **Dr. Horváth Tündének**, hogy önzetlenül tanított a kliniko-farmakologia és a hepatologia szabadgyökös ismereteire.

Köszönöm **Dr. Past Tibornak**, hogy megtanított a precíz laboratóriumi munkára új szabadgyökös modellek kidolgozásának módszerére.

Köszönöm **Dr. Arthur Cederbaum** professzor úrnak, hogy az alkoholos májkárosodás és a vasanyagcsere szabadgyökös, biokémiai vonatkozásainak alapjaira megtanított.

Köszönöm **Dr. Joseph Hoet** (†) professzor úrnak, hogy a diabetologia szabadgyökös folyamataira felhívta a figyelmemet.

Köszönöm **Dr. Belágyi József** (†) professzor úrnak, hogy az ESR vizsgálatokon keresztül a szabadgyökök biofizikai tulajdonságaira oktatott és ebben éveken keresztül együtt dolgozhattunk.

Köszönöm **Dr. Pótó László** tanár úrnak, hogy segített az ESR vizsgálatok elvégzésében és megoldotta a biomatematikai problémáinkat, illetve ezekre a megoldási módokra megtanított.

Köszönöm **Dr. Nagy Judit** professzornőnek, hogy megtanított a klinikai nephrologiára, a szabadgyökök nephrologia szerepére, a didaktikus tudományos prezentációra, támogatott egy tudományos klinikai labor felépítésében, irányította tudományos és oktató tevékenységemet.

Köszönöm Dr. Kőszegi Tamás tanár úrnak a klinikai kémiai vizsgálatokat.

Köszönöm **Dr. Kocsis Béla** tanár úrnak, hogy tanácsaival segítette a HPLC-metodika beállítását és gyakorlati tanácsokkal támogatja ilyen irányú tevékenységünket.

Köszönöm **Dr. Matus Zoltán** tanár úr folyamatos támogatását a HPLC-vizsgálatok kivitelezése során. Köszönöm **Dr. Ludány Andrea** professzornőnek a vizelet- és a szemlencsefehérjék analízisében nyújtott segítségét és együttműködését.

Köszönöm **Dr. Bíró Zsolt** professzor úrnak a szemlencse-analízisek elvégzése során nyújtott készséges együttműködését.

Köszönöm Dr. Sümegi Balázs professzor úrnak a rezveratrolos vizsgálatokhoz nyújtott támogatást.

Köszönöm **Dr. Koller Ákos és Dr. Gollasch Maik** professzor uraknak a myographos vizsgálatokkal kapcsolatos segítséget.

$dc_{360_{171}}$

Köszönöm **Prof. Dr. August Heidlandnak, Prof. Dr. Friedrich C. Luftnak** és **Prof. Dr. John C. Chathamnek** az együttműködés lehetőségét, javaslataikat, támogatásukat.

Köszönetet mondok munkatársaimnak, beosztottjaimnak, akik mellettem álltak és állnak a tudományos, gyógyító és oktató munkában:

Dr. Kovács Tibornak, Dr. Wagner Lászlónak, Dr. Wagner Zoltánnak, Dr. Mazák Istvánnak, Dr. Degrell Péternek, Dr. Vas Tibornak, Dr.Halami Richárdnak, Dr. Molnár Gergő Attilának, Dr. Laczy Boglárkának, Dr. Markó Lajosnak, Dr. Szijártó Istvánnak, Dr. Cseh Juditnak, Dr. Mikolás Esztella Zsókának, Dr. Brasnyó Pálnak.

Köszönetet mondok tudományos diákköri hallgatóimnak, akiktől sokat kaptam, akik lelkesítettek lelkesedésükkel, és akik tanítása több örömet okozott, mint amennyi fáradtságot jelentett.

Köszönetet mondok a technikai segítségért Dr. Sámikné Varga Ilonának, Bodor Enikőnek, Horváth Klaudiának, Horváth Viktóriának, Riszt Irénnek és Surján Editnek.

2. Eredeti tudományos felismerés (csatlakozó közlemény száma)

Legfontosabbnak azt a felismerésemet tartom, amely szerint nem elég az oxidatív és karbonil stressz akut hatásait kivédeni, hanem a szubakut károsodások megelőzése is szükséges ahhoz, hogy a kezelés valóban eredményes legyen. Az ehhez a gondolathoz vezető tudományos eredmények a következők:

- A glikáció és az oxidáció együttes jelenlétében termelődő glikoxidációs termékek, mint pl. az ún. AGE-fluoreszcencia és a karboximetil-lizin szérumszintje, jó szénhidrátháztartással rendelkező 2-es típusú cukorbetegekben csak beszűkült vesefunkció esetében magasabb. (I)
- 2. Az ischaemiás szivbeteg, 2-es típusú cukorbetegek GFR-je alacsonyabb, szérum-AGEszintje és vizeletalbumin-ürítése magasabb, mint a szívbetegségben nem szenvedőké. (I)
- A nem enzimatikus glikáció reverzibilitásáért felelős FN3K enzimnek a G900C polimorfizmusa, CC variánsa esetén a 2-es típusú cukorbetegség későbbi életkorban kezdődik. (II)
- 4. A metilglioxál ventromedialis hypothalamusba történő injektálásával, patkányban metabolikus syndroma kelthető, melynek hatására a vese tubulointersticiumában akkumulálódik az AGE-imidazolon és a renin, amelyek felelőssé tehetők a vese papillafibrózisáért. (III)
- 5. A jelenleg ajánlott összes prevenciós eljárást alkalmazva diabeteses nephropathiában, a kezelés ellenére is glomeruláris és tubuláris O-glikozilációs eltérések mutathatók ki a vese hisztológiai vizsgálata során, ami arra utal, hogy a hexozmanin anyagcsereút aktivácója nem volt kivédhető. (IV,V)

$dc_{360_{181}}$

- Szigorú vérnyomáskontrollt alkalmazva IgA nephropathiában a glikoxidációs termékek szintje csak akkor emelkedik meg az egészségesekhez képest, ha a vesefunkció beszűkül.(VI,VII)
- 7. HPLC-alapú eljárást dolgoztunk ki, amelynek segítségével egyszerre lehet mérni az albumin vizeletürítését és a vizeletalbumin glikoxidációját. (**VIII**)
- A vizeletalbumin glikoxidációja 2-es típusú cukorbetegekben a vesefunkcióval és nem a glykaemiával mutat kapcsolatot, és nem befolyásolja az immunológiai vizeletalbuminmeghatározást.(VIII)
- 9. A vizelet több éves, -80°C-os tárolása a vizeletalbumin-mennyiség csökkenéséhez vezet, melyben szerepe lehet a vizelet pH-jának és szulfhidril-csoport tartalmának.(**IX**)
- 10. In vitro modellünk szerint metilglixál hatására a glomeruláris vérzésre jellemző vörösvértest alakok jönnek létre.(**X**)
- 11. A metilglioxálos vörösvértest modellünkben, a metilglioxál okozta karbonil stressz oxidatív stresszhez vezetett, amely intracelluláris kálcium-akkumulációt okozott.(**XI**)
- 12. Elektronspinrezonancia és egyéb vizsgálataink alapján a metilglioxál komplexálja és redukálja a ferri vasat, amely folyamat a metilglioxál károsító hatásának fontos lépése.(**XI**)
- Végállapotú veseelégtelenségben a magasabb szérum AGE-szint (a karboximetil-lizin, CML szérumkoncentrációja) magasabb cardiovasculáris és összmortalitással jár együtt.(XII)
- 14. Végállapotú veseelégtelenségben a teljes halálozás független kockázati tényezőjének a kor, a kiindulási cardiovasculáris betegség, a dohányzás, a magas szérum CRP- és AGEszint bizonyult.(XII)
- 15. Az AGE-k és az AGE-k által okozott proteinuria nephronvesztésen keresztül olyan circulus vitiosust indít meg, amely atherosclerosishoz és a beteg halálához vezethet.(**V,XII**)
- In vitro kísérleteinkben igazoltuk, hogy a dohányfüst vizes oldata csökkenti az endotélsejtek cGMP termelését és a bradikinin kiváltotta kálcium-akkumulációját.(XIII, XIV)
- A dohányfüst vizes oldata növeli az eNOS aktiváló (Ser(1177)) és gátló (Thr(495)) foszforilációját is, de jobban emeli a gátló foszforiláció mértékét.(XV)
- A dohányfüst vizes oldata hatására a normálisan homodimer eNOS monomerekre történő szétesése volt megfigyelhető.(XV)
- A dohányfüst vizes oldata hatására az Akt (protein kináz B) aktiváló foszforilációja (Ser(473) csökkent, aminek hatása lehet számos jelátviteli folyamatra (pl. eNOS aktiváció csökken, inzulin-jelátvitele csökken, stb.). (XV)

- Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a dohányfüst vizes oldata a protein kináz Cβ-n keresztül fejti ki eNOS-hatását. (XV)
- 21. A dohányfüstnek ezek a hatásai részben, vagy teljesen kivédhetők glutationnal, mint nem specifikus aldehid- és szabadgyök-elfogóval.(**XIII-XV**)
- 22. Akut humán vizsgálatban a cigaretta szívása a vese rezisztencia indexének csökkenésével jár, ami feltehetően hyperfiltrációt okoz a vesében.(**XVI, XVII**)
- 23. In vitro, myograph-os vizsgálatok alapján a dohányfüst vizes oldatának hidrogén-peroxid tartalma az arteria renalis első oszlásán vazodilatációt vált ki, ami endotéltől független, direkt simaizomhatásként valósul meg, az L-típusú kálciumcsatornák, vagy a Na⁺-Ca²⁺- cseretranszporter befolyásolásán keresztül.(XVI)
- 24. Humán, retrospektív, hisztológiai vizsgálatunk szerint valószínűsíthető, hogy a dohányzásnak szerepe van a Kimmelstiel-Wilson-lézió kialakulásában.(**XVIII**)
- 25. Diabetes mellitusban és diabeteses illetve nem-diabeteses vesebetegekben a vizelet ortotirozin ürítése magasabb, mint egészségesek esetében, ami fokozott hidroxil szabadgyökképződésre utal.(**XIX**)
- 26. A diabeteses betegcsoportok orto-tirozin frakcionált exkréciója meghaladta a 100%-ot és a vizelet orto-tirozin koncentrációja nem korrelált a szérum orto-tirozin szintjével, amik arra utalhatnak, hogy a hidroxil szabad gyök vesében történő, *in loco* képződésével kell számolnunk.(**XIX**)
- 27. Az orto-tirozin frakcionált exkréciója tízszer magasabbnak bizonyult, mint a para-tiroziné, ami lehetővé teszi az afiziológiás orto-tirozin hatékony eliminálását.(**XIX**)
- Szemlencsefehérjék analízisével kimutattuk, hogy a diabeteses és a nem-diabeteses kataraktás lencsék vízoldékony fehérjéinek relatív fenilalanin tartalma alacsonyabb, mint az egészségeseké.(XX)
- 29. Mind az egészséges, mind pedig a kataraktás szemlencse homogenizátum fenilalanin tartalma magasabb, mint a szemlencsék vízoldékony frakciójáé.(**XX**)
- 30. A szemlencse homogenizátum DOPA, meta-tirozin és orto-tirozin tartalma magasabb, mint a szemlencsék vízoldékony frakciójáé, ami az ebben a frakcióban található fehérjék hidroxil szabadgyök-általi károsítására utal.(XX)
- 31. A diabeteses és a nem-diabeteses kataraktás szemlencsék homogenizátumában magasabb a meta-tirozin és az orto-tirozin koncentrációja, mint az egészségesekében.(**XX**)
- 32. Az orto- és meta-tirozinon növesztett zsírsejtek a 25 mmol/l glukózon neveltekhez hasonlóan – inzulin-rezisztensekké váltak. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 33. Az inzulin jelátvitelében kulcsszerepet játszó Akt aktiváló foszforilációja orto- és metatirozin hatására ugyanúgy csökkent, mint a 25 mmol/l-es glukóztartalmú médiumban.

(nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)

- 34. Az orto- és meta-tirozinon nevelt zsírsejtek a kóros aminosavakat a tápoldat glukóz- és inzulin-tartalmától függetlenül felvették és az intracelluláris fehérjékbe beépítették. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 35. Az oxidatív stressz mértéke a perifériás erek felé csökken, ami befolyásolja az erek vazodilatációs készségét inzulinra. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 36. Az oxidatív stressz növekedésével az ERK1/2 útvonal aktiválódik, ami az inzulin-hatás csökkenésével jár együtt. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 37. A femorális artériában az aortához képest sokkal kisebb az oxidatív stressz az inzulin hidrogén-peroxidon keresztül vazorelaxációt okoz. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 38. Az oxidatív stresszt akutan növelve (hidrogén-peroxid+aminotriazollal) vagy csökkentve (szuperoxid dizmutáz+katalázzal, SOD+CAT) az erek vazoaktivitását mérsékelten tudjuk csak befolyásolni. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 39. A hidroxil szabad gyök okozta oxidatív stressz végterméke, az orto-tirozin önmagában is befolyásolhatja az erek vazorelaxációját, csökkentve azt, ugyanis oxidatív stressz nélkül, orto-tirozin etetése révén is ki tudtuk váltani a hatást. (nem közölt adatok, szabadalmi közzététel: Pub.No.: WO/2012/176009, Pub.Date:27/12/2012)
- 40. Az inzulin-rezisztencia és az atherosclerosis is az oxidatív stressz következménye lehet.(**XXI**)
- 41. A pszeudóhipoxia-okozta oxidatív stressz gátolhatja a máj glukóz-6-foszfatáz enzimét.(**XXII**)
- 42. Pszeudóhipoxia modellünkben a glukóz-6-foszfatáz enzimgátlást mind a lipidperoxidáció, mind a hidroxil szabadgyök-képződés okozhatja. (**XXII**)
- 43. Pszeudóhipoxia modellünkben a vas-ATP komplex a lipid-peroxidációt a vas-EDTA komplex a hidroxil szabad gyök képződését segíti elő. (**XXII**)
- 44. Humán, 2-es típusú, inzulinrezisztens cukorbetegen végzett vizsgálatunkban elsőként igazoltuk, hogy a rezveratrol valószínűleg az orto-tirozin mennyiségének csökkentésén keresztül mérsékli az inzulin-resztenciát és csökkenti az interstíciális cukor szintjét. (XXIII)

- 45. Az endogán ouabain szérumszintje a társbetegségekkel rendelkező hypertoniás betegekben magasabb és összefügg az éjszakai vérnyomással, illetve a szubklinikus célszerv-károsodásokkal. (**XXIV**)
- 46. Az endogén ouabain nem mutat összefüggést az orto-tirozin szintjével, de az orto-tirozin szintjét a vesefunkció nagymértékben determinálja hypertoniás betegekben. (**XXIV**)
- 47. A kettős renin-angiotenzin-aldoszterin-rendszer gátlás (ACEI+ARB) nem befolyásolta az endogén ouabain szintjét hypertoniás betegekben, azonban megszűntette az ouabain szintje és a szubklinikus célszervkárosodások közötti összefüggést. (**XXV**)

3. Összefoglalás

Az akut oxidatív-, vagy karbonil stresszhatások azok, amelyeket egy akut antioxidáns kezeléssel, vagy glikációs végtermék eltávolítással (pl. egy inzulin injekció révén a szénhidrátanyagcsere rendezésével, vagy aktuális haemodialízissel) órák alatt mérsékelni lehet. Az akut hatások tartós, vagy ismétlődő fennállása azonban szubakut hatásba fordul át, és ezek már csak hetek, hónapok alatt védhetők ki (pl. cukorbetegségben hetekig tartó inzulinkezeléssel, az áttöréssel, vagy veseelégtelenségben intenzív ún. vesetranszplantációval). Természetesen ismertek az oxidatív- és a karbonil stresszre krónikusan ható tényezők is, ezek például genetikai polimorfizmusok, vagy gyakran epigenetikai módosulásokat jelentenek, amelyek a DNS, vagy a hozzá kapcsolódó hiszton változásaiban manifesztálódnak (ezek visszafordítása a jelenlegi módszerekkel nem mindig lehetséges).

A glikáció, karboniláció és oxidatív stressz tartós és ismétlődő fennállása, annak szubakut és krónikus hatásai miatt, a hagyományos antioxidáns vitaminkezelés nem lehet eredményes önmagában (lásd nagy klinikai tanulmányokban a vitaminkezelések hatástalanságát), mert ez csak az akut hatásokat célozza meg, ezért további, a szubakut és lehetőség szerint a krónikus elváltozásokra is célzott kezelésekkel kell ezt kiegészíteni. További gondot jelent egyrészt az, hogy az antioxidáns E-vitaminkezelés direkt módon a lipid-peroxidációt gátolja, és saját megfigyeléseink szerint a szubakut hatásokat jelentő elváltozások (kóros aminosavak, glikációs végtermékek képződése) inkább a vízfázisban zajlanak. Másrész a vízoldékony antioxidáns kezelés gátolhatja az agonista, pl. az inzulin kiváltotta rövid tartamú, kis koncentrációjú hidrogén-peroxid-termelést, ami pedig a hormon intracelluláris jelátviteléhez szükséges.

Vizsgálataink szerint a diabetes mellitus, a hypertonia, a krónikus vesebetegségek, a cardiovascularis betegségek és a dohányzás növeli a szabadgyök-képződést, a glikációt, a karbonilációt, és csökkenti a nitrogén-monoxid biológiai hozzáférhetőségét (3.1. ábra).

A fehérjék glikációját csökkentheti a fruktózamin-3-kináz enzim, melynek polimorfizmusai <u>KRÓNIKUS HATÁST</u> fejthetnek ki és eredményeink alapján késleltethetik a diabetes mellitus manifesztálódását.

dc_360_1³1

A hidroxil szabad gyök oxidált aminosavak (orto- és meta-tirozin) képződését indíthatja meg, amely folyamatot rezveratrollal meg tudtuk szakítani. Kimutattuk, hogy a glikációs végtermékek (pl. az imidazolon) növelhetik a lokális renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszer (RAAS) aktivitását a vesében. Az angiotenzin II és az aldoszteron aktiválja a NAD(P)H-oxidáz enzimet, aminek következtében akut oxidatív- és karbonil stressz alakul ki, amelyet a vizeletben ürített albumin módosulása révén, vagy a glomerulonephritisekre jellemző glomeruláris típusú vesevérzés modellezésével mutattunk ki. Az akut oxidatív- és karbonil stressz rontja a kockázati tényezőket (cukor-, magasvérnyomás-betegség, stb.) de a célszervkárosodások heveny progresszióját is előidézheti (<u>AKUT HATÁS</u>).

Vizsgálataink szerint az ismétlődően jelentkező akut hatásokat tartósan kedvezően befolyásolhatja a RAAS-gátlás, ami "antioxidáns" kezelésnek minősül az által, hogy csökkenti a NAD(P)H-oxidáz enzim aktivitását és adataink szerint kedvező a vesebetegség progresszója szempontjából is. Bizonyítottuk, hogy a rendszeresen ismétlődő akut oxidatív- és karbonil stressz epizódok hyperfiltrációt, O-glikozilációt, a dohányzás esetében a vesében Kimmelstiel-Wilson-léziót, a keringésben endogén ouabainszint-emelkedést, a vizeletben proteinürítést okoznak. Eredményeink arra utalnak, hogy a GFR csökkenése glikációs végtermék-, orto- és meta-tirozin-akkumulációhoz és ez által károsodásokhoz (pl. kóros fehérjeképződéshez) vezethet. Ezek a nem élethosszig tartó, szubakut károsodások (SZUBAKUT HATÁSOK) speciális kezeléseket igényelhetnek, amelyek még kidolgozásra várnak. Adataink szerint a szubakut hatások kezelése nélkül biztosan veseelégtelenséghez és mortalitás-növekedéshez vezetnek az említett folyamatok. Ezért a szubakut hatások kezelését tartom legfontosabb új felismerésemnek.

Olyan új, komplex kezelésre van szüksége betegeinknek, amely az oxidatív- és karbonil stressz akut, szubakut és krónikus hatásainak kivédésére egyaránt alkalmas.



3.1. ábra A disszertációban leírt saját eredmények (aláhúzott és kékháttérrel kiemelt helyek) és az irodalmi adatok alapján fennálló kapcsolatok összefoglaló (sematikus) ábrázolása. DM=diabetes mellitus, CKD=krónikus vesebetegség, HT=hypertonia, CVD=cardiovasculáris betegség, ROS=reaktív oxigénszármazékok, NO=nitrogén-monoxid, m-Tyr=meta-tirozin, o-Tyr=orto-tirozin, AGE=előrehaladott glikációs végtermék, FN3K=fruktózamin-3-kináz polimorfizmusa, NF-

kB=nukleáris faktor kappa-B, CRP=C-reaktív protein, RAAS=renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszer, KW-lézió=Kimmelstiel-Wilson-lézió.

4. Bevezetés

Rövidítések: ACEI = angiotenzin-konvertáló-enzim-gátló, ADP = adenozin-difoszfát, AGE = előrehaladott glikációs végtermék, ARB = angiotenzin-receptor-blokkoló, ATP = adenozin-trifoszfát, cGMP = ciklikus guanozin-monofoszfát, CML = karboximetil-lizin, DM = diabetes mellitus, eNOS = endotheliális nitrogén-monoxid szintáz enzim, Fe^{2+} = ferro ion, Fe^{3+} = ferri ion, FN3K = fruktózamin-3-kináz, FN3K-RP = fruktózamin-3-kináz-rokon-fehérje, GBM = glomerulus bazális membrán, GSH = redukált glutation, H_2O_2 = hidrogén-peroxid, HbA1c = haemoglobin A_{1c}, HPLC = nagyteljesítményű folyadékkromatográfia, IFG = emelkedett éhgyomri vércukor, IGT = csökkent glukóztolerancia, L-NMMA = N-monometil- arginin, NADH = nikotin-adenin-dinukleotid (redukált forma), NADPH = nikotin-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált forma), NF κ B = nukleáris-faktor κ B, NGT = normális glukóztolerancia, NO = nitrogén-monoxid, \cdot OH = hidroxil szabad gyök, $O_2^{-} =$ szuperoxid szabad gyök, OONO⁻ = peroxinitrit, RAGE = AGE-receptor, SOD = superoxid dizmutáz enzim, TBARS = tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák.

4.1. A 2-es típusú diabetes főbb jellemzői (XLIV, LXII)

Vizsgálataink során elsősorban a diabetes mellitus leggyakoribb okával a 2-es típusú cukorbetegséggel foglalkozunk. A 2-es típusú diabetes mellitus (DM) kialakulását, számos egyéb folyamat mellett, a perifériás szövetek (izom, zsír és máj) inzulinrezisztenciája és a β -sejtek inzulinszekréciós defektusa együttesen okozza. Ismert, hogy a 2-es típusú DM-et csökkent glukóztolerancia (impaired glucose tolerance, IGT) és/vagy emelkedett éhgyomri vércukorérték (impaired fasting glucose, IFG) előzi meg (1).

4.1.1. Az inzulinszekréció szerepe a 2-es típusú DM kialakulásában és progressziójában

IGT-ben és a 2-es típusú DM kezdetén egyszerre van jelen a hypo- és a hyperinzulinaemia. Az inzulintermelés első fázisa ugyanis csökkent, de a második fázis emelkedett, így az inzulinválasz mind az első, mind a második fázisban eltér a szükséglettől (4.1.1.1) (2).



4.1.1.1. ábra Sematikus ábrák az inzulinválaszról és néhány exogén, szubkután adott inzulin kinetikájáról. A: normális inzulinválasz első és második fázisa; **B**: IGT-ben csökken az inzulinválasz első fázisa és nő, illetve megnyúlik a második fázisa; **C**: DM-ben eltűnik az inzulinválasz első fázisa, **D**: a DM tartós fennállása esetén csökken az inzulinválasz második fázisa; **E**: összehasonlításképpen humán, gyorshatású inzulin kinetikája szubkután adagolás esetén; **F**: ultragyors hatású inzulinanalóg kinetikája szubkután adagolás esetén. Az "első" illetve "második" szó az ábrában az inzulinválasz első és a második fázisra utal. A vízszintes tengely időt, a függőleges inzulinkoncentrációt jelent (sematikusan).

Így a korai postprandiumban hypoinsulinaemia, hyperglycaemia, hypertrigliceridaemia és a korai hyperglycaemia stimuláló hatására késői postprandiális hyperinsulinaemia, majd ennek következtében hypoglycaemia alakulhat ki. A klinikai képet tovább bonyolítja az, hogy hosszan fennálló 2-es típusú DM esetén, a tartós szulfanilurea kezelés következtében, vagy a betegség spontán lefolyása során is, 5-10 évvel a diagnózis felállítása után annyira lecsökken a β-sejtek inzulintermelő

képessége, hogy a beteg hypoinsulinaemiássá válhat, most már az inzulinszekréció második fázisában is. Az inzulinszekréció második fázisában kialakuló hypoinsulinaemia létrejöttében szerepe lehet a tartósan túlstimulált β-sejtműködésnek, ugyanis ugyanabban a szekréciós granulumban található az amilin (más néven szigetsejt amiloid polipeptid, IAPP) is. Ez a hormon, mint azt a neve is mutatja, a pancreas szigetekben lokális amiloidózist képes okozni, ami károsítja a szigetsejteket. Úgy tűnik, hogy minél tovább és minél intenzívebben stimuláljuk az inzulinszekréciót, annál több amilin szekretálódik és annál hamarabb merül ki az endogén inzulintermelő kapacitás.

Pima indiánokban igazolták, hogy a diabetesbe nem progrediálók (non-progresszor) csoportjában az inzulinérzékenység és az inzulinválasz első fázisa közötti hiperbolikus az összefüggés (3).

Nincs különbség az egyes etnikumok (Amerikai Egyesült Államokban élő fekete bőrű, ázsiai, latin-amerikai és europid populációk) között abban, hogy az inzulinszekréció első fázisának csökkenése megelőzi a DM kialakulását (4).

A 4.1.1.1. ábrán sematikusan mutatjuk be az inzulinválasz jellegzetes változásait a DM kialakulása során. A 4.1.1.1. ábra A görbéje a normális viszonyokat mutatja, a megtartott első és második fázist. A 4.1.1.1. ábra B görbéje az IGT során észlelhető elváltozásokat szemlélteti, a csökkenő első és a késve jelentkező, magasabbra emelkedő második fázist. A 4.1.1.1. ábra C görbéje a korai DM-re jellemző inzulinválaszt mutatja, az első fázis eltűnt és a második fázis magas. A 4.1.1.1. ábra D görbéje a tartósan fennálló DM esetén tapasztalható inzulinválasz görbét, az első fázis eltűnését és a második fázis jelentős csökkenését demonstrálja. A 4.1.1.1. ábra E görbéje a reguláris (rövidhatású) humán inzulin és az F görbéje az ultragyors inzulinanalógok kinetikáját mutatja, és egyben utal arra is, hogy az ultragyors inzulinanalógok kinetikája jobban hasonlít a fiziológiás inzulinszekrécióra.

4.1.2.Kapcsolat az inzulin anyagcserehatása és a nitrogén-monoxid között (XL,XLIX)

Az inzulin az intracelluláris protein foszforilációs kaszkád rendszeren keresztül foszforilálja az 1177-es pozíciójú szerinen az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) enzimet és ezzel aktiválja azt (5). Az így termelődött nitrogén-monoxid (NO) hatására megnyílnak a vázizomzat prekapilláris nutritív arteriolái (ún. kapilláris "recruitment" zajlik), az inzulin eljut a nutritív kapillárisokba, amelyek endotheljén keresztülvándorolva a parenchymás sejtekben fejti ki anyagcserehatását (6). A folyamatot a 4.1.2.1. ábra mutatja be.



4.1.2.1. ábra Az inzulin metabolikus hatásának kifejlődése a vázizomzatban, fiziológiás viszonyok között.

Az NO-függő vazodilatáció és az inzulinérzékenység szempontjából is a következő rangsor állítható fel: egészségesek > obezek > 2-es típusú DM-ben szenvedők (7).

4.1.3. Az inzulinszekréció első fázisának kiesése és az inzulin-rezisztencia, illetve a hypertonia

Kísérletes eredmények szerint a glukóz-kiváltotta inzulinszekréció első fázisát csökkentette a magas glukóz koncentrációja. Az eredmények arra utalnak, hogy a magas glukóz által indukált mitokondriális szabadgyök-termelés és a kulcspozícióban thiolt tartalmazó, azaz ún. SH-enzim, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz inaktiválása vezethet az inzulinszekréció első fázisának csökkenéséhez (8). Ha csökken, vagy kiesik az inzulinszekréció első fázisa, a korai postprandiális időszakban hyperglykaemia alakul ki, ami további gátló hatást fejt ki az inzulinszekréció első fázisára (4.1.3.1. ábra).



4.1.3.1. ábra A pancreas β-sejtjeinek betegsége miatt az inzulinválasz első fázisa kiesik, ami a vázizomzatban inzulin-rezisztenciához, a szisztémás keringésben hypertoniához és szervkárosodáshoz vezet.

A magas glukózkoncentráció endotélsejt tenyészetben, az eNOS foszforilációjának megváltoztatása nélkül, csökkenti az NO-termelést (9). A hyperglykaemia és a hypertrigliceridaemia hatására, a gluko- és a lipotoxicitás miatt károsodik a nutritív kapillárisok előtt elhelyezkedő arteriolák endotélje, nő a szuperoxid szabad gyök termelése. Az eNOS szétkapcsolása és ezért az NO helyett szuperoxid szabad gyök termelése jellemző a 2-es típusú diabeteses, hipertoniás betegek trombocitáira (10). Másrészt a szuperoxid szabad gyök az NO-val peroxinitritet képez, aminek már nincs vazodilatátor hatása. Ezért az inzulin nem tudja megnyitni az arteriolákat és így az inzulinhatás sem tud kifejlődni. Ennek következményei az inzulin-rezisztencia, a hypertonia és végül a szervkárosodás.

4.2. A szabad gyökök jellemzői (XXXVIII, XL)

A szabad gyökök párosítatlan spinű elektronnal rendelkeznek, és ezért rendkívül reakcióképesek. Az egyed várható élettartama és a sejtjeiben kimutatható szabadgyökelfogó kapacitás

(pl. SOD, 11) között egyenes arányosság áll fenn, ha az egyes emlős fajokat hasonlítjuk össze. Ez a tény is mutatja a szabad gyökök jelentőségét. A biológiai terekben történő megoszlásuk alapján a szabad gyököknek két fő típusa van, a víz- és a zsírterekben megjelenő szabad gyökök. Vannak olyan gyökök is, amelyek mindkét térben előfordulhatnak.

4.2.1. A vízoldékony szabad gyökök

A biológiai rendszerekben is előforduló vízoldékony szabad gyökök közé tartozik a szuperoxid (hidroperoxi), a hidroxil, az alkil, és a tiil szabad gyök. Az alkil gyök a zsírfázisban is megtalálható (12).

A szuperoxid szabad gyök (O_2^{-}) kevésbé agresszív, mint pl. a hidroxil szabad gyök, és az O_2^{-} a molekuláris oxigén egy elektronos redukciója során képződik (13). Mérsékelt reakciókészsége miatt viszonylag nagy távolságokat képes megtenni elbomlás nélkül, pl. a sejtmembránok anion csatornáin is képes áthatolni (14).

A hidroxil szabad gyök (·OH) a Haber-Weiss /1/ vagy a Fenton /2/ reakció révén képződhet (15).

$$H_2O_2 + O_2^{-} \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^{-}$$
/1/
$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} \cdot OH + OH^{-}$$
/2/

A szervezetben, alapállapotban csak a stabilabb ferri vas fordul elő, a ferri vas redukcióját ferro vassá pl. a szuperoxid szabad gyök válthatja ki az alábbiak szerint (16):

$$\operatorname{Fe}^{3+} + \operatorname{O_2}^{-} \rightarrow \operatorname{Fe}^{2+} + \operatorname{O_2}$$
 /3/

A hidroxil szabad gyök az egyik legreakcióképesebb szabad gyök, ezért a sejtek vizes fázisában csak nagyon kis távolságot (1-3 Å) tud megtenni elbomlás nélkül (17).

Alkil szabad gyök ($R^1R^2R^3C$) keletkezhet a szénhidrátok ·OH hatására létrejövő károsodása esetén a vizes fázisban és a később tárgyalandók szerint a lipid-peroxidáció részeként is (18).

4.2.2. A zsíroldékony szabad gyökök (19)

A zsírfázisban keletkező szabad gyökök általában a lipid-peroxidációnak nevezett folyamat eredményeképpen jönnek létre. Az így keletkező szabad gyökök az *alkil* (R¹R²R³C•), az *alkoxil* (R¹R²R³CO•), a *phenoxil* (PhO•) és a *peroxil szabad gyök* (R¹R²R³COO•). Ez utóbbi a jellemző a lipidek szabad gyökös károsodására, amit ezért lipid-peroxidációnak is nevezünk. A lipid-peroxidáció kialakulásához egy indító tényezőre van szükség, mely általában a vas redukált, ferro formája. Ezt a lépést iniciációnak hívjuk. A zsírsav peroxidációs folyamata a lipid fázisban, a mindig jelenlévő oxigénnel tovább terjed (propagáció), mindaddig, amíg a keletkezett gyökök egymással nem reagálnak, és így a folyamat leáll. Ez utóbbit hívjuk terminációnak. A lipid-peroxidációs folyamat a

zsírsavak fragmentációjához vezet. Az így képződött termékek még mindig igen reakcióképesek, bár már nem szabad gyökök. A lipid-peroxidáció jelenlétének kimutatására gyakran mérik az ún. tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák (TBARS) szintjét, amely azonban nem csak a lipid-peroxidáció során változik, ezért a TBARS inkább általános oxidatív stressz markerként szerepelhet.

4.2.3. A víz és a zsírfázisban is előforduló szabad gyökök

Legjelentősebb képviselőjük a nitrogén-monoxid (NO), bár zsíroldékonysága jobb, mint a vízoldékonysága (az NO telített vizes oldata hozzávetőlegesen 3 mmol/l-es, 20). A helyes az lenne, ha a jelölésénél mindig feltüntetnénk az NO párosítatlan spinü elektronját is ('NO), azonban a mindennapi használatba enélküli rövidítése ment át.

Tekintettel arra, hogy vizsgálataink fontos objektuma volt az NO, részletesebben foglalkozunk jellemzésével. Az NO, mint említettük, elsősorban a sejtek lipid kompartmentjében koncentrálódik, de ez a fázis sokkal kisebb a testben, mint a vizes fázis, ezért a molekula nagyobb része található vízoldott formában. Nagy reakcióképességét jelzi az is, hogy élettartama szekundumos nagyságrendű (21). Hosszabb élettartamát az élő rendszerekben annak köszönheti, hogy tiol tartalmú molekulákhoz, elsősorban a glutation -SH csoportjához kötődik (22). Metallo-enzimekben az átmeneti fémekhez koordinációs kötéssel kapcsolódik (citokróm P450, 23), guanilat cikláz, haemoglobin, ciklooxigenáz, kataláz stb. (24). A klinikai gyakorlatból a nitroprusszid nátrium említendő, amelyben az NO komplex kötésben van, és ahonnan redukáló hatásokra szabadul fel (25). Az NO molekula az egyik legfontosabb direkt vazodilatátorunk. Különösen nagy sebességgel reagál el a szuperoxid szabad gyökkel, miközben peroxinitrit képződik (26).

$$\cdot$$
NO + O₂ \rightarrow ONOO⁻

/4/

/5/

A peroxinitrit élettartama szintén rövid ($t_{1/2}=0,5$ sec), hidroxil és nitrogén dioxid (NO₂·) szabad gyökké alakul:

$$ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH \rightarrow NO_2 + OH$$

Mindkettő lényegesen toxikusabb szabad gyök, mint az NO. A peroxinitrit kifejezett tiol oxidációs hatással rendelkezik, mely károsítja a sejteket (27).

A szervezetben az NO termelése enzim-katalizálta folyamat. A nitrogén-monoxid szintáz (NOS) két fő típusát különítjük el, a konstitutív (cNOS) és az indukálható (iNOS) enzimet. Továbbá két különféle konstitutív izoenzim ismert, a neuronális (nNOS) és az endotéliális NOS (eNOS). Mind citoszolikus (nNOS), mind membránokhoz kötött formája (eNOS, ami az endotélsejtekben és a thrombocytákban fordul elő) ismert. A cNOS aktiválódása rövid időtartamú, pikomólos nagyságrendű NO-termeléssel jár. Az iNOS általában kálcium independens, hosszan, órákig tartó NO-termelés jellemzi, nanomólos koncentrációban produkál NO-t, és az enzim különböző indukciók hatására

(lipopoliszaharid, citokinek: TNF-alfa, IL-1) expresszálódik, amit a glukokortikoidok gátolni képesek. Mindkét típusú NOS szubsztrátja az arginin, kofaktora a NADPH (28).

A cNOS által termelt NO fiziológiás funkciói a vazodilatáció (parakrin hormonhatásként az endotéliális NO esetében), a thrombocyta aggregáció gátlása (endokrin hormonhatásként, ha az endotélium által termelt NO hatását tekintjük, és autokrin hormonhatásként, ha a thrombocyta által termelt saját NO kiváltotta hatást vesszük figyelembe), és a neuronális ingerület-transzmisszió. Hatását a guanilát cikláz aktiválásán keresztül fejti ki, ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) által kiváltott fehérje foszforilációkon át. Ezek a hatások összességükben, többek között, kiváltják a citoplazmatikus, ionizált és diffuzibilis kálcium szintjének csökkenését is (29, 30, 31, 32).

A cNOS által termelt NO fontos funkciója lehet, hogy lipidoldékonysága révén bekerülve a biológiai membránokban, az ott zajló lipid-peroxidációs folyamat propagációját meggátolhatja az alkoxil és a peroxil gyökökhöz való kötődés révén (33).

4.3. Nem szabadgyökös oxidáló molekulák biológiai rendszerekben

A szuperoxid szabad gyök dizmutációjával képződő *hidrogén-peroxid* (H_2O_2) nem rendelkezik párosítatlan spinű elektronnal, de – mint láttuk – a szabad gyökök képződésében és átalakulásában központi szerepet játszik. Igen erős oxidálószer (34) különösen átmeneti fémek jelenlétében.

Itt is említést kell tenni a *peroxinitrit*ről, ami NO és O₂⁻. szabad gyök egymásra hatásából keletkezik (35).

4.4. A vas szerepe a szabadgyökös folyamatokban (XXXIV, XL, LI)

A vas a szervezetben különböző módon "becsomagolt" formában fordul elő (36). Ennek magyarázata abban lelhető meg, hogy a vas ferri (Fe³⁺) alakja nagyon rosszul oldódik vízben, a ferro forma pedig az oxigénnel reakcióba tud lépni, és így, szabályozatlan módon, szuperoxid szabad gyök keletkezéséhez vezethet. A vasat szállító (transzferrin, laktoferrin) és raktározó (ferritin) fehérjék finoman szabályozott rendszere megakadályozza a kontrollálhatatlan ferri redukció kialakulását, illetve a ferro oxigénnel való reakcióját. A fehérjék védő hatása nem irreverzibilis, szuperoxid szabad gyök ugyanis képes vasat felszabadítani a ferritinből (37). Ez fiziológiás körülmények között is lejátszódik, hiszen az így mobilizált vas felhasználódhat, pl. a haem szintéziséhez. Oxidatív stress során pathológiás koncentrációban szabadul fel az ún. alacsonymolekulasúlyú vas, amely talán Fe-ATP, Fe-ADP, Fe-citrát vagy egyéb Fe-komplexet jelent az intracelluláris kompartmentben. Ezek a vas komplexek, pathológiásan magas koncentráció esetén, a sejtek elektron transzport rendszereitől (mitokondriális légzési lánc, citokróm P450 típusú enzimek, oxigenáz enzimek stb.) elektront vesznek

fel, és így a ferri vas ferro vassá redukálódik, ami részben ismét szuperoxid szabad gyököt, részben lipid-peroxidációt válthat ki (38). A ferri vasat az NO is redukálni képes ferro vassá (39): $Fe^{3+} + \cdot NO \rightarrow Fe^{2+} + NO^+$ /6/

4.5. Szabadgyök-képződés diabetes mellitusban

4.5.1. Diabetes mellitus, oxidatív stressz és hypertonia

Diabetes mellitusban fokozott oxidatív stressz figyelhető meg. Ennek néhány fontosabb oka: a mitokondriális szuperoxid szabadgyök-képződés, a glukóz auto-oxidáció, a pszeudohipoxia, a poliol anyagcsereút aktiválódása, a nem-enzimatikus glikáció, a fokozott metilglioxál termelés, a NAD(P)H-oxidázok aktivitásának növekedése (egyes komponenseinek membrán-transzlokációja) és fokozott expressziója, az eNOS enzim szétkacsolódása és az iNOS enzim fokozott expressziója.

Endotélsejtekben akut hyperglykaemia hatására mitokondriális szuperoxid szabadgyöktermelés volt megfigyelhető (40). A keletkező szuperoxid szabad gyök, mint másodlagos hírvivő, indukálja a poliol anyagcsereút enzimeit, másrészt pedig az intracelluláris metilglioxál képződéséből fakadó nem-enzimatikus glikációs végtermékek keletkezését serkenti. A poliol anyagcsereút aktiválódása a NADPH fogyását eredményezi, ami pedig a redukált glutation szintjének csökkenéséhez vezet, mert a glutation reduktáz kofaktora a NADPH. Így az antioxidáns védelem gyengül, hiszen ennek fontos tagja a redukált glutation.

A glukóz redukáló tulajdonsága révén autooxidációra képes, ami azt jelenti, hogy elektront ad át oxidálószereknek, pl. a mindig jelenlévő nem-haem, redox-aktív ferri vasnak.

A magas intracelluláris glukóz-koncentráció az intermedier anyagcserén keresztül fokozott NADH-termelést eredményez. A sejtek hypoxiájára is a megemelkedett NADH a jellemző, ezért beszélünk diabetes mellitus esetén pseudohypoxiáról. A NADH magas koncentrációja esetén a NADH-oxidáz enzimek elektront képesek átvinni oxidálószerekre, ami ismét csak leggyakrabban a ferri vasat jelenti. A NADH- és a NADPH-oxidázok aktivitását növeli az extracellulárisan képződő glikációs végtermékek sejtmembránfelszini receptorhoz való kötődése és az angiotenzin II hormonhatása.

A diabeteses anyagcserezavart az eNOS enzim szétkapcsolása is jellemzi, és ilyenkor az enzim nem NO-t, hanem szuperoxid szabad gyököt termel. Egyes szerzők szerint diabetes mellitusban ez a legfontosabb az endotéliális diszfunkció kialakulásának. Kiváltó oknak a NAD(P)H-oxidázok aktiválódást tartják. Az ezek által termelt szabad gyökök az eNOS homodimer létrejöttében kulcsfontosságú cink-tiol kapcsolat kialakulását gátolják. Így eNOS monomerek jönnek létre, a monomer eNOS pedig nem NO-t, hanem szuperoxid szabad gyököt termel. Patológiás körülmények között (pl. diabetes mellitusban) termelődik egy arginin analóg, az aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA), amely szétkapcsolhatja az eNOS-t. Ráadásul az ADMA lebontásáért felelős dimetil-arginin dimetil-amino-hidroláz enzim (DDAH) redox-regulált, amely oxidatív stressz hatására inaktiválódik.

Így a DDAH inaktiválódás-ADMA-emelkedés-eNOS-szétkapcsolás révén pozitív feedback jöhet létre (41). Ennek a pozitív feedback-nek a következménye lehet az emelkedő vérnyomás és a romló anyagcserehelyzet. Az oxidatív stressz által aktivált NFκB gyulladásos citokinek termelését indítja meg és az iNOS enzim expressziója is növekszik. Az egyidejűleg emelkedő szuperoxid- és NO-termelés peroxinitrit és ezen keresztül nitrotirozin termeléséhez vezet. A peroxinitrit által kiváltott nitrozálási reakciót nitrozatív stressznek is nevezik (42, 43). Az angiotenzin II jelentőségét hangsúlyozza a nitrozatív stressz kialakulásában az a humán megfigyelés, amely szerint az angiotenzin receptor-blokkoló-kezelés gátolja diabetesben a nitrotirozin képződését (44).

Érdekes humán megfigyelés, hogy hipertoniás, 2-es típusú diabeteses betegekben glukóz terhelés során szignifikáns vérnyomás emelkedés lép föl, ami az antioxidáns hatású redukált glutationnal kivédhető. Sőt a diabeteses hypertonia redukált glutationnal csökkenthető (45).

4.5.2. Diabetes mellitus, vasanyagcserezavar, oxidatív stressz és hypertonia

A vasanyagcsere egyik leggyakoribb zavara a herediter hemokromatozis. Az erre predisponáló gén polimorfizmusok (HFE-C282Y és a HFE-H63D) közül a második alacsony penetranciájú. Lengyel populációban a HFE mutációkat hordozók a 2-es típusú diabeteses betegek 39 %-ban és az egészségesek 26 %-ában fordultak elő. A mutációk szignifikáns összefüggést mutattak a diabetes a diabeteses proteinuriával. A proteinuriások (mikro- + mellitus kialakulásával és makroalbuminuriások) vérnyomása szignifikánsan magasabb volt, mint a nem proteinuriásaké (46). Ezek szerint tehát a vasanyagcsere zavara egyszerre predisponál a 2-es típusú diabetes mellitus, a hypertonia és az albuminuria kialakulására. Az albuminuriát 2-es típusú diabetes mellitusban az endotéliális károsodás markerének tartják. Felmerül annak lehetősége, hogy a 2-es típusú diabeteses betegek eme nem kis hányada esetében (akik a herediter hemokromatosis említett két génpolimorfizmusa szempontjából hetero- vagy homozigóták) a genetikailag determinált vasanyagcserezavar endotélkárosodást okozó hatása állhat a középpontban, ugyanis a lengyel vizsgálatban a tanulmányozott mutációk egyetlen betegben sem okoztak bronzdiabetest. Ezt támasztja alá az a vélemény is, amely szerint kapcsolat áll fenn a vasanyagcsere zavara, a metabolikus syndroma és a nem-alkoholos eredetű steatosis hepatitis között (47). Az endotélkárosodás, az atherosclerosis és a hypertonia között az összefüggés magától értetődő. Az endotél károsodás azonban inzulinrezisztens diabeteshez is vezethet (48), mert a parenchymás sejtek (vázizomzat, zsírsejtek, stb.) eléréséhez az inzulinnak át kell jutnia az endotéliumon. Ez a folyamat intakt endotéliális működést igényel, ami oxidatív stressz hatására károsodik. Ilyenkor az endotéliális inzulin-internalizáció gátolt (49). Természetesen a fentiekben vázolt hipotézis nem dönti el, hogy melyik az elsődleges tényező a metabolikus syndromában, az inzulin-rezisztencia vagy az endotéliális károsodás. Számos egyéb tényező szerepét is feltételezik ugyanis a metabolikus syndroma kialakulásában (citokinek, leptin rezisztencia, rezisztin, perinatális malnutritio miatt fellépő pancreas fejlődési zavar, stb.). A felsorolt

adatok arra utalnak, hogy a haemokromatózis gén-mutációt hordozó 2-es típusú diabeteses betegekben talán inkább az endotél károsodása játszhat elsődleges szerepet. Önmagában a vas ugyan nem elég az endotél károsodásához, azonban érdekes humán megfigyelések szólnak szerepe mellett. Többszörös (\geq 8 alkalom/elmúlt 2 év) véradók esetében például a szérum ferritin szint alacsonyabb volt, mint azok esetében, akik 1-2 alkalommal adtak csak vért. A gyakoribb véradáson átesettek (alacsonyabb ferritin szintűek) NO-függő vazodilatációja (flow-mediated dilation, FMD) nagyobbnak bizonyult, mint a kontroll csoporté (50).

4.5.3. Diabetes mellitus, renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszer, oxidatív stressz és hypertonia (LIII, LVII, LXI)

Állatkísérletes modellben angiotenzin II-infúzió hatására az aortafalban vasakkumuláció, oxidatív stressz volt megfigyelhető és vaszkuláris diszfunkció alakult ki. Az angiotenzin II-kezelés eme hatásait ferri-vaskomplexáló dezferrioxaminnal csökkenteni lehetett, sőt az angiotenzin II-indukálta ér-remodellinget is mérsékelte a dezferrioxamin kezelés (51).

A 2-es típusú cukorbetegséggel társuló hypertonia kialakulásában az endotélium és a reninangiotenzin-aldoszteron-rendszer szerepe tűnik a leglényegesebbnek. A fokozott angiotenzin II-hatás következtében az erek falában aktiválódik a már említett NAD(P)H-oxidáz enzim, ami szuperoxid szabad gyököt termel (52). Ennek az enzimnek az aktiválásában szerepet játszanak a glikációs végtermékek is (53, lásd még a glikációról szóló fejezetet is). Sőt, az angiotenzin II hormon NAD(P)H-oxidáz enzimet aktiváló hatásának szerepe lehet 2-es típusú diabetes mellitusban a szigetsejt-károsodás kialakulásában is (54).

Szubcelluláris szinten egy lehetséges másik interakció az inzulin és az angiotenzin II intracelluláris hírvivői között az inzulin-szignál károsodását eredményezheti. Ennek lényege az, hogy angiotenzin II hatására a gátló helyen foszforilálódik az inzulin receptor szubsztrát-1 és 2, mely gátolja az inzulinhatáshoz szükséges foszfatidil-inozitol 3-kináz rendszer aktiválódását (55).

Paradox módon az antioxidánsok állatkísérletekben hatékonynak, de humán vizsgálatok során hatástalannak bizonyultak (56). Ezért újabban a figyelem az antioxidáns viteminok használata felől az antioxidáns hatású angiotenzin-konvertáló-enzim-gátlók (ACEI-k), angiotenzin-receptor-blokkolók (ARB-k) és statinok krónikus alkalmazása felé fordult.

4.6. Antioxidánsok

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

A haptoglobin megköti a szabad haemoglobint és haemint és így megakadályozza, hogy a haemin a széteső vörösvértestekből a keringésbe és onnan, pl. az endotélsejtekbe jusson, és ott oxidációt indítson el (62). A transferrin, a lactoferrin és a coeruloplasmin a vas megkötése és redox ciklusának gátlása révén gátolja a szabadgyök-képződést (63). A β -karotin (64) és az E vitamin (65) gátolja a lipid-peroxidációt. A C-vitamin a hidroxil szabad gyök elfogója (66). A glutation mind a vízoldékony mind a zsíroldékony szabad gyökök elfogójaként szerepelhet, bár plazma szintje igen alacsony (0,5-2 µmol/l közötti, 67, 68). A sejtek extracelluláris felszínéhez kötötten található szuperoxid dizmutáz (SOD) a szuperoxid-hidrogén-peroxid átalakulást katalizálja (69).

Az intracelluláris térben is megtalálhatók az előzőekben említett vitaminok, az A, C, E vitamin, hasonló hatásspektrummal (70). Itt is fontos szerepet játszik a glutation, különösen azért, mert egy NADPH-dependens enzim (a glutation reduktáz) ebben a kompartmentben végzi az oxidált glutation (GSSG) visszaredukálását. A NADPH-t a pentóz foszfát shuntben a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz és a 6-foszfo-glukonát dehidrogenáz biztosítja a NADP⁺ redukciója révén. A glutation egyben szubsztrátja a glutation peroxidáznak is, amely nemcsak a hidrogén-peroxidot, hanem a lipidperoxidokat is elbontja. A glutation peroxidáz aktiválásához szelénre is szükség van (71). Az intracelluláris SOD hasonlóan az extracellulárishoz, a szuperoxid-hidrogén-peroxid átalakulást katalizálja (72):

$$2O_2^{-} + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (7/$$

A hidrogén-peroxid lebontását nem csak a glutation peroxidáz, hanem a kataláz is végzi (/8/ egyenlet, 73):

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \qquad (8/$$

4.7. A nem-enzimatikus glikáció (XXVI-XXXIII, XXXVI, XLII, XLIII, XLVII)

4.7.1. A nem-enzimatikus glikáció definíciója

A nem-enzimatikus glikáció a glukóz, enzim által nem katalizált, kovalens kapcsolódását jelenti aminosavak, fehérjék, lipidek és nukleinsavak szabad aminocsoportjához. Az így keletkezett terméket Schiff-bázisnak nevezik, melyből spontán átrendeződés után először instabil, ún. Amadori termékek, majd stabil, ún. glikációs végtermékek alakulnak ki. Ez utóbbiakra az angol nyelvű irodalom az advanced glycation end products (AGE) elnevezést használja. Az egész folyamatot a táplálkozástudomány terminológiája szerint Maillard reakciónak nevezzük.

4.7.2. Előzmények

Maillard 1916-ban írta le, hogy aminosavat és redukáló cukrot tartalmazó elegyben barna szín fejlődik ki (74). Ezután hosszú évtizedeken keresztül csak a táplálkozástudománnyal foglalkozók érdeklődtek a jelenség iránt, és kimutatták, hogy a barnulási reakcióban a redukáló cukor a fehérjék

aminocsoportjával és másodlagosan a guanidinocsoporttal kerül kapcsolatba (75). Fény derült arra is, hogy az ételek, pl. a kenyér ízét és illatát éppen ezek a Maillard termékek adják (76, 77, 78). Igazolták, hogy az ételek készítésekor, a Maillard reakció során, számos aldehid képződik, pl. formaldehid, acetaldehid (79).

Az orvos-biológiai kutatások a glikációt hosszú időn keresztül, helytelenül, glikozilációként említették. A glikoziláció elnevezés ugyanis mind angolul, mind magyarul a fehérjék poszt-transzlációs, enzimatikus módosítását jelöli, amelynek során cukrok épülnek be a fehérje molekulába.

4.7.3. A nem-enzimatikus glikáció kémiája

A nem-enzimatikus glikáció a már említett Schiff-bázis képződéssel indul (80). Feltételezhető, hogy a glikáció megindulását a glukóz molekula aktivációja előzi meg (81), melynek során a glukóz szabad gyökké alakul, ami reaktívabb, mint a kiindulási molekula. Az emberi szervezetben zajló glikáció a proteinek és az aminosavak esetében elsősorban a lizin és az arginin módosulását jelenti. A Schiff-bázisból, molekulán belüli átrendeződések után, közti termékek, ún. Amadori termékek képződnek. A molekula továbbalakulása enediol létrejöttét eredményezi.

A következő lépésben az enediol, a biológiai rendszerekben mindig jelenlévő ferri (Fe³⁺) vasnak elektront ad le, a glukózból származó szénlánc leválik a fehérjeláncról vagy az aminosavról, és így szabad dialdehidek képződnek (82, 83). A legtoxikusabbak (3-dezoxiglukozon, glioxál és metilglioxál) közül a metilglioxál viselkedésének tanulmányozásában jelentős előrelépést tettek Szent-Györgyi Albert és munkatársai is (84). A képződött aldehidek rendkívül gyorsan elreagálnak a környezetükben található aminocsoportokkal, miközben heterociklikus molekulák pl imidazolon és pentozidin is termelődhet, melyek a glikációs végtermékek közé tartoznak. Másrészt viszont a dialdehidek két, térben közellévő fehérjelánc összekapcsolását is előidézhetik, ha egy-egy aldehidcsoportjuk másik-másik fehérjén lévő aminocsoporttal lép reakcióba.

A ferri (Fe³⁺) vas ferro (Fe²⁺) vassá redukálódása, a glikált molekula elektron leadása (azaz oxidációja) miatt az egész reakciót glikoxidációnak is nevezik. Irodalmi adatok szerint a vas jelenléte nemcsak teljessé teszi a glikoxidáció folyamatát, hanem fel is gyorsítja azt, katalizátorként működve (85). A reakciósorban termelődő ferro vas szuperoxid szabad gyök keletkezését idézi elő, ami hidrogén-peroxiddá alakulhat.

A Bayer-Villiger reakcióban a még kötött dialdehid a leírtaknak megfelelően képződő hidrogén-peroxiddal tovább oxidálódik és, egy átmeneti termék képződése után, a szintén glikációs végtermékként számontartott karboximetil-lizinné vagy acetamid keresztkötéssé alakul át (86).

Glikálódhat a foszfolipidek közül pl. a foszfatidil etanolamin aminocsoportja is. Az említett szabadgyökös folyamatok miatt a foszfolipidek glikációja során fokozódhat a lipid-peroxidáció (87).

Az ismertetett kémiai reakciók során fellépő szabad gyökös folyamatok hatására gyakran következik be fehérje- és DNS-degradáció, illetve fehérje-polimerizáció is. Nem meglepő ezért, hogy

pl. a carboximetil-lizin képződését nagymértékben befolyásolják az antioxidánsok (88). A carboximetil-lizin képződése pl. liponsavval (közismert –SH csoportot tartalmazó, nem specifikus szabad gyök fogó), szuperoxid dizmutázzal, katalázzal, E vitaminnal és dezferrioxaminnal (amely a ferri vasat komplexálja, megakadályozva a ferro vas kialakulását) is csökkenthető. Gátolja a glikációs végtermékek kialakulását az aminoguanidin is, amely bár szabadgyök-elfogó hatással nem rendelkezik, de a korai glikációs termékekhez kötődve megakadályozza azok továbbalakulását.

4.7.4. A haemoglobin glikációja

A haemoglobin glikációja során tulajdonképpen a haemoglobin globin láncainak glikációja következik be. Ezen reakció vizsgálata több szempontból is jelentős. Egyrészt, mert a globin láncok (α és β) glikáltsága információt szolgáltat a diabeteses beteg glikaemiás állapotáról a vizsgálat időpontja előtti 2-3 hónapra visszamenőleg, másrészt a diabeteses komplikációk pathogenezisének megértését is elősegíti. A különböző mérési módszerek azonban néha eltérő eredményeket adnak. A diabeteses betegek cukor-anyagcseréjének vizsgálatára az elfogadott paraméter a HbA_{1c}. Elgondolkodtató azonban, hogy szintjének szokványos módon történő mérését sokáig a diabetes diagnózisára alkalmatlannak tartották (89) és az egészséges populáció egyedeinek eredményei jelentős szórást mutatnak (90). Ennek hátterében, az ismert HbA_{1c} értéket módosító tényezők mellett (felgyorsult vörösvértestképzés, transzfúzió, stb.) felmerül annak a lehetősége is, hogy a HbA_{1c} nemcsak a glykaemiát tükrözi. Ez vezetett a HbA_{1c} standardizációjához, ami már lehetővé teszi felhasználását a 2-es típusú cukorbetegség diagnózisára (American Diabetes Association ajánlása).

4.7.5. A glikációs végtermékek mérésére használatos módszerek

Néhány eljárás, ami szóba jön: a glikációs végtermékek immunhisztokémiai, vagy immunelektronmikroszkópos kimutatása szövettani metszetekben, testnedvekből történő identifikálásuk kompetitív ELISA-val, nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) vagy ezt kiegészítve tömegspektroszkópiával (MS), vagy (in vivo transzdermális) fluoreszcencia révén.

Immunhisztokémiai módszerrel többen igazolták már különböző szövetekben a glikációs végtermékek jelenlétét (88, 91, 92). Pentozidin, imidazolon és karboximetil-lizin felszaporodását észlelték a diabetes mellitusban a kiszélesedett mezangiumban, a megvastagodott kapilláris- és artériafalban, a noduláris lézióban, a tubulus sejtekben és testszerte az atherosclerotikus léziókban is. A karboximetil-lizin szöveti szintje a kor előrehaladtával egészségesekben is emelkedik. Az imidazolon magasabb koncentrációja mutatható ki nem diabeteses eredetű vesebántalmakban (minimal change-nephrosisban, IgA nephropathiában, lupus nephritis WHO III. típusában, fokális segmentális glomerulosclerosisban, és végállapotú veseelégtelenségben) a tubulus sejtekben, diabeteses és nem diabeteses uraemiás betegek aorta falában. Immuncitokémiai (immun-

elektronmikroszkópos) módszerrel bizonyították, hogy a glikációs végtermékek koncentrációja, a kor előrehaladtával, különös mértékben a vese proximális tubulus sejtjeinek sejtmagjában, emelkedik (93).

Kompetitív ELISA módszerrel igazolták többek között azt is, hogy egészségesek vizeletében 100 és 1000 Dalton közötti molekulasúlyú glikációs végtermék mutatható ki, ami a veseelégtelenségben szenvedőknél további nagy molekulasúlyú termékkel egészül ki (94).

A HPLC-t használó módszerrel, pl. pentozidint, CML-t lehet kimutatni plazmából vagy szövetmintákból amely nem-invaziv módszer, aminek azonban az a hátránya, hogy drága és időigényes (95).

A glikációs végtermékek mérésére régóta felhasználják ezen anyagok fluoreszcens tulajdonságát. Már az 1980-as évek óta ismert, hogy a diabetes következtében a vérben fluoreszcens anyag jelenik meg, aminek excitációs maximuma 350-370 nm, emissziós hullámhossza 440-460 nm (96). Érdekes új, nem-invazív módszer a bőr auto-fluoreszcenciájának mérése, amelynek a diagnosztikában elfoglalt helye még nem ismert.

4.7.6. A karbonil stressz

A fluoreszcencia felhasználásával 370 nm-es excitációnál és 440 nm-es emissziónál az ún. nem specifikus glikációs végtermékek mérhetők, melyek szabadgyökös károsodás, pl. irradiáció vagy hidrogén-peroxid okozta fehérje módosítás eredményeként is keletkezhetnek (97, 98). Nem meglepő ez az átfedés, ugyanis a szövetek szabadgyökös károsodása során ugyanúgy reaktív aldehidek termelődnek, mint a nem-enzimatikus glikáció folyamatában. Éppen ezért, a közös kémiai háttér miatt karbonil stresszről is beszélünk (99). A szabad gyökök által okozott oxidatív stressz során reaktív aldehidek, pl. malondialdehid és 4-hidroxi-nonenal is termelődik. Arra is fény derült, hogy a malondialdehid nem csak a lipid-peroxidáció végterméke, hanem aminosavak, sőt szénhidrátok szabadgyökös károsodása során is képződhet (100). Ez a dialdehid ugyanolyan reakcióképes a szabad aminocsoportokkal, mint a metilglioxál, amely a fehérjékkel és az aminosavakkal kémiai kötést hoz létre (101).

4.7.7. A nem-enzimatikus glikáció pathophysiológiája

Az élettani folyamatokat a glikációs termékek szervezetbe történő <u>bevitel</u>ének, a szervezetben végbemenő <u>keletkezés</u>ének, <u>lebomlás</u>ának és <u>elimináció</u>jának egyensúlya jellemzi. Ezen egyensúly felborulása a glikációs termékek felszaporodásához vezet (4.7.7.1. ábra).



4.7.7.1. ábra A glikációs végtermékek fokozott bevitele, termelődése és visszatartása a szervezetben circulus vitiosus kialakulásához vezet. AGE = advanced glycation end products (glikációs végtermékek).

4.7.7.1. A glikációs végtermékek szervezetbe történő bevitele

Immunológiai módszerrel sikerült igazolni, hogy a táplálékok különböző mennyiségű glikációs végterméket tartalmaznak. Különösen megemelkedik mennyiségük a hőkezelés hatására. Humán vizsgálatok kimutatták, hogy ezek a glikációs végtermékek az ételek elfogyasztása után megjelennek a vérkeringésben is, azaz a glikációs végtermékek nem bomlanak le a gasztrointesztinális traktusban lévő emésztő enzimek hatására, hanem intakt állapotban felszívódnak (102). Tehát az ételekben lévő glikációs végtermékek mennyisége mellett a gasztrointesztinum állapota is befolyásolja a keringésbe kerülő glikációs végtermékek mennyiségét.

A kívülről bevitt glikációs végtermékek másik forrása a dohányfüst. A dohányfüstben reaktív aldehideket lehet kimutatni (103). Ezek az aldehidek glikációs végtermék-szerű molekulák keletkezését indukálják a dohányfüstben, ami inhaláció révén, a tüdőn keresztül a keringésbe kerül (104).

4.7.7.2 A glikációs végtermékek keletkezése a szervezetben

A nem-enzimatikus glikáció folyamatosan zajlik a szervezetben, a keringésben, a sejtekben és az intersticiális térben. Mivel kémiai reakcióról van szó, a képződés sebessége a glukóz koncentrációjával arányos. Normoglykaemia esetében is számolnunk kell a glikációval, és ezért glikációs termékek a nem diabeteses egyénekben is kimutathatók. A glikációs termékek szintje a kor előrehaladtával folyamatosan emelkedik, elsősorban az egyes szervek lassan megújuló fehérjéiben, mint amilyen, pl. a bőr vagy más szervek fehérjetermészetű kötőszöveti állománya (105, 106, 107). Ezek a kötőszöveti fehérjék a glikáció következtében elveszítik normális fiziko-kémiai tulajdonságaikat, hidráltságuk, oldékonyságuk megváltozik, ami a kötőszövet rugalmasságának csökkenésével jár együtt (108). A glikált kötőszöveti fehérjék a kötőszövet megújításában szerepet játszó fehérje-emésztő enzimekkel szemben rezisztensebbé válnak, és így még tovább perzisztálnak (109). Talán ilyen és ehhez hasonló jelenségek vezetnek az idősödő emberek bőrének ráncosodásához is.

4.7.7.3. A glikációs végtermékek <u>felvétele</u> a sejtekbe (AGE-receptorok)

A vérben termelődő vagy a keringésbe a gasztrointesztinumból és a tüdőből (a dohányzással) bejutó, fehérjékhez kötött glikációs termékek 93 %-át a máj veszi fel (110). Hozzávetőlegesen 60 % a máj endotélsejtjeibe, 25 % a Kupffer sejtekbe és 10-15 % a máj parenchyma sejtekbe kerül. Ezen sejteken ún. scavanger receptorok találhatók, és ezeken keresztül zajlik a glikációs termékek felismerése és endocitotikus bekebelezése. Hasonló tulajdonságú scavanger receptorok a makrofágok felszínén is megtalálhatók, amelyek az oxidált és acilált LDL-t is megkötik, és így jelentős szerepet játszanak az atherosclerosis kialakulásában (111). Glikációs terméket vehet fel még sok más receptor is, mindenekelőtt az ún. RAGE (a **r**eceptor, amely az **AGE**-t képes megkötni) (112). Pontosan nem tudjuk, hogy a receptorok milyen molekularészt ismernek fel, de mesterségesen előállított fehérjékkel (elsősorban albuminnal) végzett kísérletek arra utalnak, hogy a proteinek formaldehiddel vagy metilglixállal történő módosítása során keletkezik olyan termék, amely megindítja a receptorkötődést (113). Ezek a proteinek mind polianionná válnak, és ez a töltésváltozás valószínűleg fontos szerepet játszik receptoriális felvételükben, mert egészen más struktúrájú polianionok is szerepelnek ezeknek a receptoroknak a szubsztrátjai között.

A makrofágok felszínén található scavanger receptorokat azonosították, és kiderült, hogy a korábban p60-nak nevezett receptor nem más, mint az OST-48 (114) a p90 pedig a 80 K-H (115) jelzésű fehérje. Az OST-48-at korábban a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban mutatták ki, a 80 K-H-ról pedig kiderült, hogy a protein kináz C szubsztrátja. Ez utóbbi azért is fontos, mert a protein kináz C fontos tagja az intracelluláris jelátvitelnek, ami arra utal, hogy a glikációs végtermékek által kiváltott aktiváció beleavatkozik az intracelluláris foszforilációs kaszkád rendszerekbe is. Kimutatták azt is, hogy a makrofágok galectin-3 nevű felszíni fehérjéje is megköti a glikációs termékeket (116).

A p60 és p90 típusú glikációs végtermék-receptorokat T lymphocytákon, endotél-, mezangium-, fibroblast- és simaizomsejteken is sikerült detektálni (117).

Pathológiás állapotokban (diabetes mellitusban, gyulladásos és nem-gyulladásos vesebetegségekben) fokozott mértékben expresszálódnak az AGE-receptorok (RAGE) a vese különböző sejtjein, pl. a mezangium-, a vese vascularis és glomeruláris endotél-, simaizom-, kapszuláris epithel-, és podocyta-sejtjein, valamint a proximalis tubulusok sejtjein is (118). A RAGE expressziója a tumor nekrózis faktor-α-val fokozható (119).

A glikációs termékek receptorainak aktivációja, a NAD(P)H-oxidáz rendszeren keresztül intracelluláris szabadgyök-képződéshez vezet. A p21^{ras}/mitogén aktiválta protein (MAP) kináz rendszer aktivitása nő a glikációs termékek hatására (120). Ennek az intracelluláris foszforilációs jelátviteli rendszernek a szabályozását a sejtek redox regulációja végzi (121). Az AGE-k hatására a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) inhibitor (I- κ B) molekula részlete leválik az NF- κ B-ről. Az aktív NF- κ B ezután a citoplazmából a sejtmagba transzportálódik, ahol bizonyos génszakaszokat aktivál (122). Az NF- κ B által aktivált gének közé tartozik az AGE receptor is (123). Ily módon, az AGE-k által indukált AGE receptor-expresszió bizonyos fokig szabályozza a sejtek, igényekhez igazodó, glikációs terméke-felvételét. Az intracelluláris szabadgyök-képződés révén sejtkárosodás jön létre, a glikációs termékek termelődésétől távoli szervekben is. Az NF- κ B aktivációjának megelőzésére eredményesen használták in vitro rendszerben a szulfhidrilcsoportot tartalmazó, szabadgyökelfogó hatású liponsavat (124).

4.7.7.4. A glikációs végtermékek *lebontása*

A fehérjék lizin aminosavának glikációja és annak átrendeződése során képződő termék a fruktózamin. A fruktózamint egy enzim, a fruktózamin-3-kináz (FN3K) ATP felhasználásával foszforilálja, amelynek során a fruktóz-lizinből frukóz-lizin-3-foszfát jön létre. A fruktóz-lizin-3-foszfát instabil és ezért spontán módon lizinre, 3-dezoxi-glukozonra és anorganikus foszfátra bomlik. A 3-dezoxiglukozon toxikus termék, ami továbbalakul 3-dezoxifruktózra vagy 2-dezoxi-3-ketoglukonsavra (125). Az FN3K nem csak a fruktózamin foszforilációját, hanem a pszikózamin és a ribulózamin foszforilációját is katalizálja. Az FN3K enzimhez hasonló aktivitású a fruktózamin-3-kináz-rokon protein (FN3K-RP), amely a pszikózamin és a ribulózamin foszforilációját katalizálja (126). Az FN3K enzim különösen aktív az agyban, a vesében és a szívben, az FN3K-RP-aktivitásának megoszlása egyenletesebb a különböző szervekben (127, 128). Feltételeznek egy másik mechanizmust is, ami még a fruktózamin kialakulása előtt, a glikáció első lépésébe, a Schiff bázis-képződésnél avatkozik bele. Ennek lényege az lenne, hogy az ún. transzglikáció révén a glikált proteinekről a szénhidrát molekularész kismolekulasúlyú aminocsoporttal rendelkező molekulákra (taurin, redukált glutation, stb.) kerül át és ezek az alacsonymolekulasúlyú termékek azután a vesén keresztül kiürülnek (129). Jelen tudásunk szerint a glikáció svégtermékek lebontására nincs lehetőség.

4.7.7.5. A glikációs végtermékek <u>elimináció</u>ja4.7.7.5.1. A glikációs végtermékek szöveti lerakódása

A glikációs végtermékek szöveti lerakódása ugyan csökkentheti a keringó glikációs végtermék-szintet, de ez nem jelent valódi eliminációt, hiszen fokozott szöveti károsító hatás jön létre. Az endotélsejtek felveszik a máj Kupffer sejtjei által már részben lebontott glikációs végtermékeket és utána gyakorlatilag változatlan formában továbbítják a subendotéliális térbe. Ez a folyamat hasonlóan megy végbe, mint a hormonok endotéliális transzcitózisa (pl. inzulin), ezért feltehető, hogy mindkettőben az endotélium sejt caveolaris membránja vesz részt. Ha így van, akkor nem meglepő, hogy a glikációs végtermékek befolyásolják az endotélsejtek NO-termelését is, hiszen az eNOS enzim a caveolaris membránhoz kötött.

A glikációs végtermékek az endotélsejtekben adhesios molekulák (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1, intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) termelését indítják meg. Ez utóbbiak hatására a makrofágok kitapadnak az endotélre, majd a subendotéliális térbe vándorolnak. A keringésben lévő és az intersticiális térbe bevándoroló monocyta-makrofág rendszer sejtjei bekebelezik a glikációs végtermékeket és átalakítják azokat (130). Az inzulin koncentrációfüggően fokozza a makrofágok glikációs végtermék-felvételét (131). Ha a glikált fehérjemolekula az LDL Apo-B apoproteinje, akkor a makrofágok fokozott aktivitással veszik fel az LDL-t, miközben az atherosclerosisra jellemző habos sejtekké (foam cells) alakulnak át (132).

A glikált fehérjék degradálódása során a glikációs végtermékek nem detoxifikálódnak a makrofágokban, hanem kismolekulasúlyú lebomlási termékekké alakulnak át (low-molecular weight AGE, LMW-AGE) (133). A glikációs végtermék-fragmentumok eljutnak az ér mélyebb rétegeibe is, aktiválják az ott levő simaizomsejteket, melyek kötőszöveti fehérje túlprodukcióval, proliferációval és citokin illetve növekedési faktor-termeléssel reagálnak.

Az endotélsejt, a hozzá kötődő glikált vörösvértestek hatására áteresztővé válik, így a plazmafehérjék egy része, különösen az albumin átjut az intersticiális térbe (134). Mindezek az eliminációs folyamatok ahelyett, hogy detoxifikálnának, inkább fokozzák a glikációs végtermékek toxicitását, hiszen a degradáció során, a molekulasúly csökkenésével ezek a termékek még mobilisabbakká válnak.

4.7.7.5.2. A glikációs végtermékek veseeliminációja vesekárosodáshoz vezet

A glikációs végtermék-fragmentumok egyedüli, valódi eliminációs szerve a vese. Mint már említettük, a vese proximális tubulus sejtjei nagy számban expresszálnak AGE receptort (RAGE). Állatkísérletes adatok szerint a glikációs fehérje fragmentumok, a kismolekulasúlyú fehérjékhez (pl. inzulin) hasonló módon, szabadon filtrálódnak át a glomerulusokon, a proximális tubulusok felszínén lévő RAGE-khoz kötődnek, a tubuláris sejtekbe reabsorbeálódnak, és tovább degradálódnak (135,

136). A vérben keringő glikációs termékek a glomerulus bazális membránon (GBM) való átjutás során kapcsolódhatnak a membrán fehérjéihez. Az ott in situ termelődő dialdehidek a GBM fehérjéi között kereszthidakat létesíthetnek. Ezek a folyamatok a GBM normális negatív töltését csökkenthetik azáltal, hogy egyrészt a membránhoz kötött heparinoidok mennyiségét csökkentik, másrészt a termelődő szabad gyökök a negatív töltésű sziálsav maradékok lehasadását okozzák. A keresztkötések létrejötte a pórusátmérő növekedéséhez vezethet. A vérben keringő fehérjéknek a GBM-hez való kötődése a membrán megvastagodását okozza. A glomeruláris endotélsejtek, hasonlóan a vasculáris atherosclerosis pathomechanizmusánál leírtakhoz, fokozottan áteresztővé válnak, ami szerepet játszhat a proteinuria kialakulásában és progressziójában. A termelődött szuperoxid szabad gyök, a vese haemodinamikájának regulációjában fontos NO-t hatástalanítja, illetve peroxinitritet képez, ami sejttoxikus. A mezangiumsejtek a glikációs termékek hatására fokozzák extracelluláris mátrix fehérje termelésüket, ami mezangiális expanzióhoz vezet (137). A mezangiumsejtek emellett, hasonlóan a simaizomsejtekhez, citokineket és növekedési faktorokat is termelnek, amik szerepet játszhatnak a korai stádiumban a glomeruláris hipertrófia, hiperfiltráció és a proteinuria kialakulásában (138). A mezangiumsejt normális viszonyok között az intraglomeruláris nyomás szabályozásának egyik fontos szereplője, mert simaizom-szerűen viselkedve kontrakcióra és relaxációra képes. Ha a glikációs termékek lerakódása miatt megnő a sejtekben a szabad gyökök koncentrációja, akkor elveszíthetik relaxációs képességüket.

4.8. Vesebetegség és oxidatív stressz (LIV)

Vesebetegségekben már az urémia kialakulása előtt oxidatív stressz-jelenségek figyelhetők meg a vérben és a vizeletben. Feltételezhető, hogy ennek hátterében a karbonil stressz fejezetben említettek vezető szerepet játszanak. Úgy tűnik, hogy kifejezetten érintett a glutation redox-rendszer (139, 140), amire indirekt módon az is utal, hogy a keringésben viszonylag korán megjelenek a szérumalbumin különböző oxidált formái (141). Egyesek a GSH-GSSG redox rendszer mellett az antioxidáns enzimek (SOD, kataláz, glutation peroxidáz), az LDL-oxidáció mértékét és az előrehaladott protein oxidációs termékek (AOPP) meghatározását ajánlják végállapotú veseelégtelenségben (142). Az AOPP nem csak végállapotú veseelégtelenségben használható, hanem pl. IgA nephropathiában is prognosztikus értékű lehet (143), sőt predializáltakban a cardiovasculáris betegségek prediktoraként is szerepelhet (144). Mégis a legtöbben – talán egyszerűsége miatt is – a lipid-peroxidáció markerének tartott malondialdehidet vagy az ún. tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák (TBARS) mérését végzik (145, 146).

Hemodializis kezelés során kimutatták a nitrozatív stressz jeleit is, ami a peroxinitrit fokozott képződésére utal. Legkevesebb 6 fő nitrozilációs helyet identifikáltak a plazmafehérjéken, amelyek közül az egyik valószínűleg a cöruloplazmin lehet (147).

A preurémiás-urémiás betegek intravénás vaskezelése – a fentiek alapján nem meglepő módon – további oxidatív stresszt okozhat, amelynek pontos szerepe a szervkárosodások kialakulásában egyelőre vitatott (148, 149).

Sokan hangsúlyozzák, különösen veseelégtelenségben a hiper-homociszteinémia szerepét az oxidatív stressz kialakulásában, bár ennek sem oka, sem cardiovasculáris következménye, sem pedig kezelése pillanatnyilag nem tisztázott (150).

Az oxidatív stressz hatására, az NF-κB aktiválódása révén, citokinek termelődnek. Ez a gyulladásos jelenség különösen aktívnak tűnik veseelégtelenségben, akkor is, ha nem gyulladásos eredetű a vese-alapbetegség. A citokinek hatására eritropoetin-rezisztencia alakulhat ki. Ennek az egész folyamatnak a megindítója a karbonil stressz termékek retenciója, melynek legeredményesebb kezelése a vesetranszplantáció (151). A szubklinikai gyulladás csökkenti egy fehérjének, a fetuinnak szintézisét a májban, ami viszont extraosszeális, vaszkuláris és valvuláris kalcifikációhoz vezet, ami urémiában a fokozott oxidatív stresszel együtthatva emeli a cardiovasculáris mortalitást (152). Kevésbé egyértelmű az urémiás oxidatív stressz E vitaminnal történő kezelésének kedvező hatása, de úgy tűnik, hogy van haszna a dialízismembránhoz kötött E vitamin alkalmazásának (153).

4.9. A proteinuria (XXXV, XXXVII, XXXIX, XLV, XLVI, LV, LVIII)

A vesében a keringésből kilépő fehérjemolekula bekerül a primer vizeletbe, ami eljut a tubulusba. Ott a proximális tubuláris sejtek aktív (energia-, azaz ATP-igényes) folyamat eredményeképpen a fehérjét visszatartják. Ha ez a reabszorpció, a túlterheltség miatt már elégtelen, a fehérje megjelenik a vizeletben, először mikro-, majd makroalbuminuria, végül a glomerulus és a tubulus kiterjedt károsodása esetén nem-szelektív proteinuria alakul ki. A nem-szelektív proteinuria azt jelenti, hogy már nem csak az albumin és az annál kisebb molekulák, hanem az albuminnál nagyobb fehérjék is megjelennek a vizeletben.

4.9.1. A proteinuriát megakadályozó vesestruktúrák

A proteinvesztés megakadályozásában négy fő tényezőt tételeznek fel: a kapilláris endotéliumot, a glomerulus bazálmembránt, a podocytákat és a tubulus sejteket.

4.9.1.1. Endotél és glomerulus bazálmembrán

A tankönyvi adatok szerint az endotélium a vesében fenesztrált és ezért nem játszik jelentős szerepet a fehérje-visszatartásban, újabb feltételezések szerint azonban az endotélsejtek glikokálixa mégis képes lehet a fehérjék visszatartására. A glomerulus bazálmembrán diabetesben elveszíti normális negatív töltését és pórusainak átmérője megnő. Ezek elősegítik az albumin és a nagyobb molekulasúlyú fehérjék extravasatioját.

4.9.1.2. Podocyta és nephrin

A diabetes-okozta proteinuria pathogenezisét kutató legújabb vizsgálatok két glomeruláris struktúrára, a podocytákra és a podocyta állábakat összekötő ún slit-membránra fókuszálnak. A podocytáknak jelentős szerepük van a filtrációs barrier fenntartásában. A podocyta állábak között feszülő slit-membrán számos ismert (nephrin, CD2-asszociált fehérje, podocin és alfa-actinin) és még ismeretlen fehérjéből álló struktúra, amely kritikus szerepet játszik a proteinuria megakadályozásában. Ezen fehérjék közül a legtöbbet vizsgált, és talán a legfontosabb a nephrin. A nephrin mRNS-ével – amely protein kináz C szabályozás alatt áll (154) – végzett vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy mind 1-es, mind 2-es típusú diabeteses betegek proteinuriával járó vesebetegségében szignifikánsan alacsonyabb a nephrin mRNS mennyisége (155). Egyes tanulmányok szerint a nephrinvesztés hátterében a nem enzimatikus glikáció és az angiotenzin II hatása állhat (156). A diabeteses nephropathiában mind az angiotenzin-konvertáló-enzim-gátló (ACEI; perindopril) (157), mind az angiotenzin-receptor-blokkoló (ARB) (irbesartan) gátolta a nephrin vesztést és a proteinuriát (158). Állatkísérletekben az ARB kedvező hatásai – legalábbis részben – az oxidatív stressz csökkentésén keresztül valósultak meg (159). Az előzőkben többször említettem, hogy az angiotenzin II aktiválja a NAD(P)H-oxidázokat. Diabeteses nephropathiában a NAD(P)H-oxidáz gátlása nem csak a hidrogénperoxid termelését csökkenti, hanem a proteinuriát és a mezangiális mátrix-túltermelést is mérsékli. Sőt a NAD(P)H-oxidáz által termelt szabad gyök iniciáló és eNOS-t szétkapcsoló szerepét igazolja az, hogy a NAD(P)H-oxidáz gátlása hatására nő az NO-termelés (160).

4.9.2. Proteinuria és nephronvesztés

A protein megjelenése a primer vizeletben, a már említett módon aktiválja a tubuláris fehérjereabszorpciót, ami a tubuláris sejtek oxidatív stresszéhez, gyulladásos mediátorok termeléséhez, tubulointersticiális fibrózishoz és végeredményben a nephron pusztulásához vezet. A folyamatot a proteinuriás nephron "öngyilkosságának" is hívhatjuk (161), ami része a szervezet védekező mechanizmusainak. Amennyiben csak néhány nephron proteinuriás, akkor a nephronpusztulás gátolja a – szervezet számára oly fontos – fehérje elveszítését. Akkor azonban, amikor a vese minden nephronja proteinuriás, pl. diabetesben vagy glomerulonephritisekben ez a védekező mechanizmus károssá válik, hiszen az egész veseállomány pusztulásához és veseelégtelenséghez vezet.

Egyre több adat lát napvilágot arról, hogy a vesefunkció (glomerulus filtrációs ráta, GFR) beszűkülése, még a normális, vagy a normális tartományhoz közeli értékek esetén is, növeli az atheroscleroticus szövődmények rizikóját. Hasonló következtetést lehet levonni abból, hogy a növekvő albuminuria nem csak a kóros, hanem már a normál tartományban is folytonosan növeli az atherosclerosis kockázatát (162). A krónikus vesebetegség és a mikroalbuminuria prevalenciája közötti szoros összefüggés sem kérdéses (163). Így a kóros albuminuria egyszerre jelzi az endotéliális diszfunkciót és a progresszív vesebetegséget (164).
4.10. Dohányzás és oxidatív, illetve karbonil stressz (XVII)

Rövidítések: BK: bradikinin, **cGMP**:ciklikus guanilát monofoszfát, **DFO**: dezferrioxamin mezilát, **DFP**: dohányfüst puffer, **GSH**:glutation, **NAC**: N-acetilcisztein, **NO**: nitrogén-monoxid, **NOS**: nitrogén-monoxid-szintáz enzim, **NP**: nátrium nitroprusszid.

A dohányzás nem csak a cardiovasculáris-, hanem a vesebetegségek kockázati tényezőjeként is ismert. Mitöbb, nem csak az aktív, hanem a passzív dohányzás is szerepet játszik a krónikus vesebetegségek (CKD) inciációjában és progressziójában, sőt a dohányzás inzulinrezisztenciához és a diabeteses nephropathia kialakulásához és progressziójához is vezethet. Mivel a CKD a fokozott cardiovascularis morbiditás és mortalitás kockázati tényezője, ezeknek a betegeknek csökken az életkilátása és romlik az életminősége. A dohányzás mindkét nemben független prediktora a végállapotú veseelégtelenségnek és növeli az albuminuria, proteinuria kockázatá is. Az adatok azt támasztják alá, hogy a dohányzás által megnövelt atherogén kockázat emeli az arteria renalis sztenózisának valószínűségét és így az ischaemias vese rizikóját is. IgA és lupus nephropathiában a dohányzás egyértelműen gyorsította a progressziót. A vesepótló kezelésben részesülő dohányosok mortalitása magasabb, mint a nem dohányos társaiké. A pathomechanismusban számos tényező játszik szerepet, azonban minden esetben kiemelhető az oxidatív stressz jelentősége.

A dohányzás inzulin-rezisztenciát okoz és növeli az inzulin-rezisztenciával járó 2-es típusú cukorbetegség, a metabolikus syndroma és a diabeteses nephropathia kockázatát (4.10.1. táblázat).

4.10.1. táblázat A dohányzás indukálta vesekárosodás pathomechanismusa (XVII)

Hyperfiltratio

ismétlődő akut hiperperfúziók + krónikus endotéliális károsodás → hyperfiltratio
Oxidatív stressz

- A CKD kifejlődésével parallel: nő a malondialdehyd + hidrogén-peroxid
- Csökken a glutation-peroxidáz + kataláz + szuperoxid-dizmutáz aktivitása
- A dohányfüst vízoldékony komponensei
 - \rightarrow vazoaktív reaktív oxigén- és nitrogen-termékek
 - → gyulladásos génexpresszió → endotéliális diszfunkció
- Dohányosokban csökken az NO biológiai hozzáférhetősége + CKD- betegekben: alacsonyabb NO-termelés → renális vazokonstrikció + mezangiális sejtproliferáció

Reverzibilitás

- Ismeretlen az ún. "point of no return" a dohányzás okozta vesekárosodás során
- A dohányzás abbahagyása általában csak a nem súlyos dohányosokban okoz albuminuria normalizálódást

Epidemiológiai tanulmányok szerint a dohányzás növeli a GFR-t, azaz hyperfiltratiót okoz, ezért feltételezhető, hogy speciálisan hat a renális artériák tónusára.

A diabeteses noduláris glomerulosclerosis, vagy másnéven a Kimmelstiel-Wilson-lézió (KW) és a nem diabeteses noduláris glomerulosclerosis (non-diab NGS) számos hasonlóságot mutat. Ugyanakkor a non-diab NGS mindig dohányosokban jelenik meg, ezért feltételeztük, hogy a KW kialakulásában is szerepe lehet a dohányzásnak (**XVII**).

A cigarettafüst kétféle szabadgyököt tartalmaz (165). A kátrány a dohányfüst azon része, melynek 99 %-a lerakódik a cigaretta filterében. A kátrány számos, relatíve stabil szabadgyököt tartalmaz (166). A másik része a dohányfüstnek az úgynevezett gáz fázis, mely átmegy a filteren és kis oxigén- és szén-központú, sokkal reaktívabb szabadgyököket tartalmaz, mint a kátrány (165).

Feltételezhető, hogy a dohányzás során a szervezetbe bejutó, a vérben hosszabb-rövidebb ideig keringő anyagok elsősorban az erek endotéljét károsítják. A chronikus dohányosok érendotélsejtjei duzzadtak, subendotéliálisan gyakori az ödéma és nem ritkák az érfal atherosclerotikus elváltozásai sem (167,168).

Az endotéliális nitrogén-monoxid (NO) termelődése függ az eNOS enzim expressziójától és a fehérje poszttranszlációs módosulásaitól is (169). A poszttranszlációs módosulásokat is befolyásolhatja a dohányfüst. Az eNOS aktivitásának poszttranszlációs módosításáért felelőssé tehetők kofaktorok, szubsztrátok, protein-protein interakciók és foszforilációs változások. Az eNOS Ser(1177) pozíciójának gyors foszforilációja figyelhető meg pl. shear stress (169), inzulin (170), vagy bradikinin (171) hatására, amelyek mindegyike növeli az enzim aktivitását és így az NO termelődését.

A Thr(495) pozíció a kalmodulin-kötőhelyen található és negatív regulátorként szolgál, foszforilációja csökkenti az eNOS aktivitását (171-173). Protein kináz C (PKC) elősegíti a Thr(495) foszforilációját stimulálatlan endotélsejtekben (171,173). Az eNOS foszforilációja ezeken a helyeken reciprok foszforilációt jelent, azaz az egyik előtérbe kerülése a másik visszaszorulását eredményezi (174). Az eNOS aktivitásának szabályozása a Ser(1177) és a Thr(495) foszforilációja révén rendkívül komplex különböző protein kinázok (PK) és protein foszfatázok (PP) befolyásolják. Az Akt (PKB) kiváltotta Ser(1177)-foszforiláció kritikus fontosságúnak tűnik az eNOS aktivitása szempontjából (173). Shear-stress (175) vagy bradikinin hatására (176) további PK-k, mint pl. a cAMP-dependens PK (PKA) foszforilálhatja az eNOS-t a Ser(1177) pozícióban. Ugyanakkor a PKA aktiválja a PP1-et, ami defoszforilálja a Thr(495) reziduumot, és így aktivált eNOS-hoz vezet (173). Ellentétben ezzel, a PKC kiváltotta eNOS-inaktiválódás a Thr(495) foszforilálódását és a Ser(1177) defoszforilálódását jelenti (173).

5. VIZSGÁLATOK 1: Az oxidatív stressz, a glikáció és a karbonil stressz diabetes mellitusban, vesebetegségekben és dohányzásban

Rövidítések: ACE = angiotenzin-konvertáló-enzim, AGE = előrehaladott nem enzimatikus glikációs

végtermékek, AGE-FL = AGE-fluoreszcencia, ATIIR = angiotenzin II 1-es típusú receptor, CEL = karboxietil-lizin, CML = karboximetil-lizin, CRP = C-reaktív protein, DA = diabeteses albuminuria, DM = diabetes mellitus, DNP = diabeteses nephropathia, ESRD = végállapotú veseelégtelenség, FPG = éhomi plazmaglukóz, GFR = glomerulus filtrációs ráta, HMW = nagymolekulasúlyú, IFG = emelkedett éhomi plazmaglukóz, IgANP = IgA nephropathia, IGT = csökkent glukóztoleranciáról, NGT = normál glukóztolerancia, OGTT = orális glukóz tolerancia teszt, ö.e. =önkényes egység, TBARS = tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák,

5.1. Vizsgálatok diabetes mellitusban (I)

5.1.1. Bevezetés

A reaktív aldehidek a fehérjék poszttranszlációs modosulását okozhatják. A metilglioxál lizinnel történő kölcsönhatásában karboxietil-lizin (CEL), glioxál és lizin reakciójában karboximetil-lizin (CML) képződhet. Az utóbbi években ismertté vált, hogy ezek az AGE-nak nevezett termékek nem csak a glikáció során, hanem az oxidatív stressz hatására is létrejöhetnek, amire különösen jó példa a CML (177, 178). Mivel kialakulásukban sokszor glikációs és oxidációs folyamatok egyaránt szerepelnek, ma inkább glikoxidációs termékekről beszélünk (179). Némely AGE jellemző fluoreszcenciát mutat, amelyek excitációs maximuma 350 és 390 nm közötti és emissziós csúcsa 440 és 490 nm között található (180). Vannak ugyanakkor nem fluoreszkáló AGE-k is, mint pl a CEL és a CML.

A normálisnak mondott öregedési folyamat során a szöveti AGE-tartalom folyamatosan emelkedik (181). Fokozott szöveti AGE akkumuláció figyelhető meg a fokozott képződés miatt, pl. diabetes mellitusban és a csökkent elimináció miatt veseelégtelenségben (182). Diabetes mellitusban számos szövetben emelkedhet az AGE mennyisége (183,184), miközben gyakran normál, vagy enyhén emelkedett szérum szintet észleltek (185-187). Végállapotú veseelégtelenségben a szérum-AGE-szintje nagyon jelentősen megemelkedik (188,189) és nem találtak különbséget a diabeteses és a nem diabeteses uraemiások között (190), ami hangsúlyozza az AGE-k eliminációjában a vesének a jelentőségét.

Kevés és egymásnak ellentmondó adat áll rendelkezésre a CML szérum és vizelet szintjeit illetően diabeteses betegek esetében. Ezért 2-es típusú diabeteses betegek szérum- és vizelet-CML-szintjét és -ürítését vizsgáltuk egy nagyszenzitivitású módszer felhasználásával. A vese szerepét vizsgálva tanulmányoztuk az összefüggést a glomerulus filtrációs ráta (Cockroft-Gault szerint számított érték) (191) és az AGE szintek között. Egy másik célkitűzésünk szerint kapcsolatot kerestünk az AGE-k és a szénhidrát háztartás paraméterei között. Végül vizsgáltuk a szérum-AGE-szintek és a diabeteses szövődmények (retinopátia, neuropátia, ischaemiás szívbetegség és albuminuria) esetleges összefüggéseit is.

5.1.2. Betegek és módszerek5.1.2.1. Betegek

Random szérum mintákat és 24 órás gyűjtött vizeletet nyertünk 109 2-es típusú cukorbetegtől (46 nő, 63 férfi, átlagos kor: 63,8, tartomány: 35 - 83 év). Glomerulus filtrációs rátájukat (GFR) a Cockroft-Gault képlet szerint számoltuk: 1,23 x [(140 - kor) / szérumkreatinin (μ mol/l)] x testsúly (kg). A nők esetében a fenti képletet megszoroztuk 0,85-tel. Normál vesefunkcióról akkor beszéltünk, ha a GFR > 80 ml/perc (ezt a vizsgálatunkat a nemzetközi ajánlások 60 ml/perces értékének elfogadása előtt végeztük). Eszerint, az érték szerint vesekárosodást mutatott 56 beteg (GFR: 51 ± 17 ml/perc), míg 53 betegnek normális volt a vesefunkciója (GFR: 104 ± 25 ml/perc). Kontroll csoportjaink jellemzői a következők voltak: a szérum szintek szempontjából kontroll csoportunk 23 egészséges önkéntesből állt (4 nő, 19 férfi, átlag kor: 41,0, tartomány: 32 - 59 év, GFR: 106 ± 22 ml/perc). A vizeletvizsgálatok szempontjából a kontroll csoport 10 egészséges önkéntesből állt (5 nő, 5 férfi, átlag kor: 63,6, tartomány: 54 - 73 év, GFR: 103 ± 8 ml/perc). A vizsgálatot a Pécsi Regionális Kutatás-Etikai Bizottság engedélyezte, és a résztvevők minden esetben beleegyező nyilatkozatot adtak.

A diabeteses szövődményeket az 5.1.2.1.1. táblázat mutatja.

	Glomerulus filtrációs ráta				
	≥ 80 ml/perc	< 80 ml/perc	Teljes populáció		
Neuropátia (autonom vagy szenzoros)	N = 53	<i>n</i> = 56	<i>n</i> = 109		
Nincs neuropátia	37 (70)	38 (68)	75 (69)		
Neuropátia	16 (30)	18 (32)	34 (31)		
Retinopátia	<i>N</i> = <i>53</i>	<i>n</i> = 56	<i>n</i> = 109		
Nincs retinopátia	42 (79)	30 (53)	72 (66)		
Nem-proliferatív retinopátia	11 (21)	20 (36)	31 (28)		
Proliferatív retinopátia		6 (11)	6 (6)		
Cardiovasculáris szövődmények	N = 53	<i>n</i> = 56	<i>n</i> = 109		
Ischaemiás szívbetegség ^a	31 (59)	38 (68)	69 (63)		
Hypertonia	49 (93)	53 (95)	102 (94)		
Albuminuria	<i>N</i> = 46	<i>n</i> = 42	n = 88		
Normoalbuminuria(<30 mg/nap)	25 (54)	15 (36)	40 (45)		
Mikroalbuminuria(30-300 mg/nap)	17 (37)	17 (40)	34 (39)		
Makroalbuminuria (> 300 mg/nap)	4 (9)	10 (24)	14 (16)		

5.1.2.1.1. táblázat A szövődmények előfordulása a diabeteses betegek között

Az abszolut számokat és (a százalékokat) adtuk meg. ^aMyocardialis infarctus, angina pectoris vagy EKG eltérés az anamnézisben.

5.1.2.2. Módszerek

Az 50-szeresre higított szérum minták AGE-specifikus fluoreszcenciájának intenzitását 460 nm-en mértük 355 nm-en történt exctitációt követően (Victor 2, Wallac, Freiburg, Germany). Annak ellenére, hogy a szérumban nem AGE-természetű fluoreszcens komponensek is előfordulhatnak, az adott excitációs és emissziós hullámhossz alkalmazásával mért fluoreszcens intenzitás túlnyomó többsége az AGE termékek számlájára írható (192). A szérum AGE-fluoreszcenciát az önkényes egységben (ö.e.) megadott fluoreszcens intenzitás és a szérum összfehérje hányadosaként fejeztük ki. A szérum és a vizelet CML-koncentrációt kompetitív ELISA módszerrel határoztuk meg a 4G9 monoklonális anti-CML antitest (Alteon Inc., New York, NY) felhasználásával (193). A CML meghatározás előtt a szérum mintákat Proteinase K (194) hozzáadásával enzimatikus hidrolízisnek vetettük alá, hogy a szérumfehérjék rejtett CML-epitópjai is hozzáférhetővé váljanak az antitestek számára. Mivel a CML a vizeletben túlnyomórészt szabad, nem fehérjéhez kötött formában van jelen, enzimatikus hidrolízisre a vizelet CML koncentrációjának meghatározásához nem volt szükség. A

hidrolizált szérum és natív vizelet mintákat 20-szorosra higítottuk 20 mmol/l TRIS, 150 mmol/l NaCl és 0,05 % Tween (ICI America Co., Bridgewater, NJ) tartalmú oldatban (pH 7,4). Az abszolút CML koncentráció meghatározásához N-(karboximetil-)amino-kapronsavat (Alteon Inc., New York, NY) használtunk standardként. Az ELISA lemezeket 1 mg/l glikált bovin szérum albuminnal (AGE-BSA) inkubáltuk 1 órán át. Háromszori kimosást követően a szérum illetve a vizelet mintákat valamint a kalibrációs standardokat peroxidázzal konjugált monoklonális anti-CML antiszérummal inkubáltuk 2 órán keresztül. Újabb háromszori mosás után a színreakciót 0,3 g/l 2,2'-azino-di-3-etilbenztiazolinszulfonsavat és 0,01 %-os hidrogén-peroxidot tartalmazó 0,01 %-os glicin/citrát pufferrel váltottuk ki. Az abszorbciót mikrotiter ELISA olvasóban (Multiskan Ascent, Labsystems, Helsinki, Finland) 405 nm-nél mértük (referencia: 603 nm-nél). A szérum-CML-szintet ng CML/mg proteinben, a vizelet-CML-ürítést pedig mg CML/napban adtuk meg.

A szérumban fehérjéhez kötötten illetve szabad formában keringő CML arányának becsléséhez mindhárom csoportból (egészséges személyek, normál vesefunkciójú, ill. beszűkült vesefunkciójú betegek) 10 egyén szérum mintájának nagymolekulasúlyú (HMW) frakcióját Omega Microsep 10 kD filterrel (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI) szeparáltuk. Ezután mind a teljes szérumban, mind pedig a HMW frakcióban meghatároztuk a CML koncentrációt és kiszámítottuk a HMW-CML/össz-CML hányadost.

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

A három vizsgált csoport (egészséges egyének, normális illetve beszűkült vesefunkciójú diabeteses betegek) eredményeinek összehasonlításához variancia analízist alkalmaztunk, post hoc Bonferroni teszttel. A két diabeteses betegcsoport klinikai adatainak összevetéséhez független változós, kétszélű, Student-féle t-tesztet illetve χ^2 próbát végeztünk. A statisztikai vizsgálatot az SPSS programcsomag segítségével hajtottuk végre (SPSS Inc., Chicago, IL).

5.1.3. Eredmények

A két diabeteses betegcsoport (a normális és a károsodott vesefunkciós csoport) hasonlóságait és eltéréseit az 5.1.3.1. táblázat mutatja.

	Glomerulus fi		
	\geq 80 ml/perc	< 80 ml/perc	Р
Ν	53	56	_
Nem (nő/férfi)	17/36	29/27	< 0,05
Kor (év)	$58,7\pm8,2$	$68,6\pm5,5$	< 0,01
Diabetes tartama (év)	$13,9 \pm 6,8$	$18,5 \pm 7,6$	< 0,01
$BMI^{a} (kg/m^{2})$	$31,1 \pm 3,7$	$29,2\pm4,9$	< 0,05
Hemoglobin A_{1c} (%)	$7,5 \pm 1,6$	$7,4 \pm 1,6$	NS
Fruktózamin (µmol/l)	331 ± 90	322 ± 66	NS
Plazmaglukóz (mmol/l)	9,1 ± 3,0	$8,9 \pm 3,3$	NS
Setriglicerid (mmol/l)	$2,4 \pm 2.2$	$2,4 \pm 1,3$	NS
Seösszkoleszt(mmol/l)	$5,5 \pm 1,3$	$5,8 \pm 1,4$	NS
SeHDL koleszterin (mmol/l)	$1,1 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,4$	NS
Glomerulus filtrációs ráta (ml/min)	$103,7\pm24,6$	$50,8\pm16,9$	< 0,001
Sekreatinin (µmol/l)	$84,5 \pm 15,8$	$142,4 \pm 62,2$	< 0,001
Sekarbamid nitrogén (mmol/l)	$6,3 \pm 1,7$	$10{,}9\pm6{,}0$	< 0,001
Sehúgysav (µmol/l)	241 ± 78	294 ± 120	< 0,01
UAE ^b (mg/nap)	50 ± 109	91 ± 223	NS

5.1.3.1. táblázat A nomális és a károsodott vesefunkciójú diabetesesek összehasonlítása

 $Atlag \pm SD.$ ^aBMI: testtömegindex. ^bUAE: 24 órás albuminürítés, Se = szérum

A normális vesefunkciójú diabeteses betegek szérum-CML-szintje és szérum-AGEfluoreszcenciája nem különbözött a kontrollokétól. A csökkent vesefunkciójú diabeteses betegek azonban magasabb szérum-AGE-fluoreszcenciát mutattak, mint a kontrollok, és mint a normális vesefunkciójú cukorbetegek (p<0,01 mindkét esetben). A csökkent vesefunkciójú cukorbetegek szérum-CML-szintje magasabb volt, mint a kontrolloké (p<0,01) és HMW/teljes CML arányuk alacsonyabb, mint a kontrolloké vagy a normál vesefunkciójú cukorbetegeké (p < 0,01; 5.1.3.2. táblázat).

content tublicat seel un 1161 pur unever et es vieletet envie invanisetus unasetesesensen					
	Kontrollok	Diabetesesek			
		G	FR		
		$\geq 80 \text{ ml/perc}$	< 80 ml/perc		
Szérum-AGE-FL					
(ö.e./mg összfehérje)	366 ± 84	448 ± 91	581 ± 175^{a}		
Szérum-teljes-CML					
(ng/mg összfehérje)	$4,0\pm0,9$	$5,5 \pm 1,9$	$6,3 \pm 3,6^{b}$		
Szérum-HMW/teljes CML					
(%)	$94,4 \pm 8,1$	$95,1\pm8,1$	$81,5 \pm 7,5^{a}$		
Vizelet-CML-ürítés		1.50 + 0.05	1 22 1 2 200		
(mg/nap)	$1,76 \pm 0,62$	$1,79 \pm 0,95$	$1,33 \pm 0,78^{\circ}$		

5.1.3.2. táblázat Szérum AGE-paraméterek és vizelet CML-kiválasztás diabetesesekben

Átlag \pm SD. ^ap < 0,01 vs. betegek GFR \geq 80 ml/perc vagy kontrollok. ^bp < 0,01 vs. kontrollok. ^cp < 0,05 vs. betegek \geq 80 ml/perc.

A csökkent vesefunkciójú cukorbetegek szérum-CML-szintje és AGE-fluoreszcenciája negatív korrelációt mutatott a számolt kreatinin clearance-szel (GFR, 5.1.3.1. ábra)



5.1.3.1. ábra Negatív korreláció mutatható ki a szérum-AGE-FL és a CML-szint valamint a számított kreatinin clearance (GFR) között a csökkent vesefunkciójú cukorbetegek csoportjában. A panel: n = 56, r = -0.599, p<0.0001). B panel: n = 56, r = -0.481, p=0.0002.

A 5.1.3.3. táblázat korrelációs mátrixot mutat a szérum-AGE-paraméterek és a vesefunkció között, a csökkent vesefunkciójú cukorbetegek csoportjában. A szérum-AGE-paraméterek egymással és a vesefunkciót mérő értékekkel is szignifikáns korrelációban voltak.

	Szérum-AGE-FL	Szérum-CML
Szérum-AGE-FL		
(ö.e./mg összfehérje)	-	0,721 ^a
Szérum-CML (ng/mg összfehérje)	0,721 ^a	-
Szérumkarbamid nitrogén (mmol/l)	0,777 ^a	0,685 ^a
Szérumkreatinin (µmol/l)	0,663 ^a	0,635 ^a
GFR (ml/min)	-0,599ª	-0,481 ^b

5.1.3.3. táblázat Korrelációk a vesefunkciós paraméterek és a szérum-AGE-értékek között a csökkent vesefunkciójú cukorbeteg csoportban.

GFR (számolt kreatinin clearance) < 80 ml/perc, n = 56, ^ap < 0,0001, ^bp = 0,0002.

A normális vesefunkciójú betegek esetében a szérum-AGE-paraméterek nem mutattak korrelációt a vesefunkcióval. A szérum-CML-szint korrelált az AGE-FL-lel a kontroll csoportban is (n = 23, r = 0.579, p < 0.005).

A 24 órás CML-ürítés hasonló volt a kontroll és a normális vesefunkciójú diabeteses csoportban, de alacsonyabbnak bizonyult a csökkent vesefunkciójú diabeteses csoportban (5.1.3.2. táblázat). A vizelet-CML-koncentráció nem korrelált a vizeletalbumin-koncentrációval.

A két diabeteses csoportban nem volt kapcsolat a szérum-AGE-paraméterek (fluoreszcencia és CML) valamint a következő értékek között: vizeletalbumin-kiválasztás, plazmaglukóz, fruktózamin, HbA_{1c}, triglicerid, összkoleszterin, HDL-koleszterin, testtömegindex, kor, diabetes tartama és a diabeteses szövődmények (retino-, neuropátia, ischaemiás szívbetegség) között.

5.2. A nem enzimatikus glikáció megfordíthatóságának genetikája (II)

5.2.1. Bevezetés

A fruktózamin-3-kináz enzim

A nem enzimatikus glikációt (NEG) sokáig irreverzibilis folyamatnak tekintették, azonban néhány évvel ezelőtt a fruktózamin-3-kináz enzim (FN3K) felfedezésével egy új, intracelluláris enzimatikus deglikációs folyamat került felismerésre (195-197). A deglikációért felelős enzim alacsony molekulasúlyú fruktózaminokat (pl. fruktózlizin) és egyéb fehérjékhez kötött fruktózaminokat foszforilál a harmadik szénatomon, melynek következtében egy instabil vegyület keletkezik, ami spontán módon (pár órás felezési idő alatt) bomlik szervetlen foszfátra, 3-dezoxiglukozonra és a deglikált aminocsoportra (5.2.1.1. ábra) (195-200).

A fruktózamin-3-kináz enzim genetikai háttere

A FN3K-gén a 17q25 lókuszban található, 6 exonja egy 309 aminosavból álló, 35 kDa molekulasúlyú enzimet kódol, mely ubikviter módon fejeződik ki szöveteinkben. Megfigyelték azonban, hogy azokban a szövetekben (pl.: idegszövet, vese, szív, vörösvértestek), amelyek nagymértékben ki vannak téve a cukorkárosító hatásának, expressziója fokozottabb (201,202).

Az FN3K deglikációban betöltött szerepét állatkísérletes modellben is igazolták. FN3K -/egerekben az intracelluláris glikált fehérjék szintje több mint kétszer magasabb volt a kontroll egerekhez képest (203). Az FN3K-génben hat SNP-t írtak le, melyek közül három mutatott összefüggést az enzim aktivitásával (204). Az irodalmi adatokat összegezve megállapítható, hogy az FN3K fontos szerepet tölt be a deglikáció folyamatában és ez által lényeges enzim a nem enzimatikus glikáció (NEG) kivédésében.

Megvizsgáltuk az FN3K-gén G900C polimorfizmusának (rs1056534) összefüggését a a 2-es típusú diabetes mellitussal (T2DM), az allélfrekvenciák eloszlását T2DM-ben szenvedő betegekben és egészséges kontrollokban. Tanulmányoztuk továbbá a diabeteses mikrovaszkuláris szövődményekre, különös tekintettel a diabeteses nephropathiára való esetleges hajlamosító/védő hatását.

5.2.2. Betegek és módszerek

A tanulmányunkba 859 T2DM-ben szenvedő beteget és 265 egészséges kontroll személyt vontunk be. A betegek a Pécsi Tudományegyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologia Centrum gondozásában állnak. A kontroll csoportot traumatológiai osztályok betegei, véradó donorok és egyetemi dolgozók szolgáltatták, esetükben klinikai anamnézisük, fizikális vizsgálatuk, illetve labor paramétereik alapján cukorbetegség, illetve egyéb krónikus belgyógyászati betegség nem igazolódott. A T2DM-et a WHO kritériumai alapján diagnosztizáltuk. A klinikai paramétereket rutin laboratóriumi módszerekkel határoztuk meg. A betegektől nyert DNS-mintákat és a klinikai adatokat a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Genetika Intézet biobankjában tároljuk. A kutatásban résztvevő egyének írásos beleegyező nyilatkozatot tettek, és munkánkat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta.

A genetikai vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Genetika Intézetében végeztük. A vizsgálandó DNS-mintákat rutin kisózásos módszerrel perifériás vér leukocitáiból nyertük. A genotipizálást polimeráz láncreakció/restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (PCR/RFLP) módszer segítségével végeztük.

A DNS-minták G900C SNP analízise során a vizsgálandó szakaszt PCR-rel történő felsokszorozásához a következő specifikus oligonukleotid primerpárokat alkalmaztuk: forward 5'-GGT TTC CCC AGA TCC TTC TTC; reverse 5'-GAC AGG GGG ATT GGT ATG TG. A keletkezett 400 bázispár (bp) hosszúságú PCR terméket agaróz gélelektroforézissel 1,5 %-os gélben vizsgáltuk. A PCR termékből 15 µl–t 1U Eco130I (StyI) restrikciós endonukleázzal (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) hasítottuk, és a keletkezett fragmentumokat 3 %-os etídium-bromidos (Fluka Chemie Gmbh, Buchs, Svájc) agaróz gélben analizáltuk. A módszer egy obligát Eco130I enzimhasítási helyet tartalmaz, mely a PCR terméket 139 és 261 bázispár hosszúságú fragmentumokra hasítja GG genotípusú minta esetében. CC genotípus esetén 43 bp, 96 bp és 261 bp hosszúságú szakaszok detektálhatók. Az amplifikációt MJ Research PTC 200 típusú PCR készülék (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) segítségével végeztük a következő hőprogramot alkalmazva: 1. lépés 96°C 2 perc; 2. lépés 96°C 0,5 perc; 3. lépés 60°C 0,5 perc, 4. lépés 72°C 0,5 perc 30 ciklusban ismételve, majd ezt követően 72 °C 5 perc végső extenzió.

Az amplifikáció 50 μ l végtérfogatban zajlott, mely 30 μ l vizet, 10 μ l Betaine–t, 5 μ l reakciópuffert (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris–HCl, pH 9,0), 1 – 1 μ l specifikus primer párt, 1 μ l dNTP–t, illetve 1 μ l Taq polimerázt tartalmazott. A mixbe 1 μ g DNS–t tettünk.

Statisztikai elemzéshez az SPSS program 15.0-ás verzióját használtuk (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A szignifikancia szintet p<0,05-ben határoztuk meg. A folytonos adatok összehasonlításához az ANOVA-t, illetve a Kruskal-Wallis tesztet követő Mann-Whitney U-próbát használtuk. A potenciális zavaró faktorokra korrigáltan kovariencia-analízist (ANCOVA) végeztünk. A kvalitatív adatok esetében a chi-négyzet próbát, a késői diabeteses komplikációk kialakulásának rizikó becsléséhez logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk.

5.2.3. Eredmények

Tanulmányunkban az FN3K-enzim G900C polimorfizmusának T2DM-re gyakorolt hatását, továbbá a diabeteses mikrovaszkuláris szövődményekkel való kapcsolatát kutattuk. A kapott genotípus eloszlást az 5.2.3.1. táblázat foglalja össze. A betegcsoportok között az egyes genotípusokban nem volt szignifikáns különbség, továbbá a genotípus eloszlás követte a Hardy-Weinberg egyensúlyt. A betegek klinikai jellemzőit, laborparamétereit az 5.2.3.2. táblázat foglalja össze genotípusok szerinti csoportosításban.

5.2.3.1 táblázat: A fruktózamin-3-kináz G900C	polimorfizmusának genotípus szerinti e	eloszlása
T2DM-ben és egészséges kontroll személyekben		

	FN3K G900C				
	GG	GC	CC		
	(%)	(%)	(%)		
T2DM	41	54	5		
Egészséges kontroll	43	51	6		

FN3K: fruktózamin-3-kináz; T2DM: 2-es típusú diabétesz mellitus

5.2.3.2. táblázat: A 2-es típusú cukorbetegek és az egészséges kontroll személyek fő klinikai jellemzői és laborparaméterei a fruktózamin-3-kináz gén G900C polimorfizmusának genotípusai szerint

	Kontroll személyek			T2DM		
	GG	GC	CC	GG	GC	CC
	n=116	n=135	n=14	n=349	n=467	n=43
Nem (ffi/nő)	57/59	55/80	5/9	162/187	224/243	17/26
Kor (év)	52,4±1,13	54,4±1,10	51,7±1,41	62,5±0,71	64,4±0,62	65,0±1,90
Testtömeg index (kg/m ²)	26,0±0,35	25,6±0,34	27,8±0,65	31,5±0,33	31,6±0,28	33,0±0,92
Fruktózamin (µmol/l)	N/A	N/A	N/A	342±5,66	344±4,85	350±14,2
Éhomi vércukor (mmol/l)	N/A	N/A	N/A	8,78±0,20	8,93±0,17	8,85±0,52
Szérumkreatinin (µmol/l)	N/A	N/A	N/A	119,1±9,9 4	122,7±8,4 4	127,4±18, 0
eGFR, MDRD (ml/min)	N/A	N/A	N/A	59,5±1,91	59,3±1,67	59,0±5,09
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	139±1,70	135±1,40	133±4,92	135±0,98	134±0,88	137±2,28
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	85±0,84	85±1,25	83±1,99	80±0,54	81±0,52	81±1,44
Inzulinkezelés (%)	-	-	-	61,1	62,7	63,9
Statinkezelés (%)	N/A	N/A	N/A	55,1	52,2	51,4
RAAS-gátlás (%)	N/A	N/A	N/A	77,9	75,9	73,7

eGFR: becsült glomerulus filtrációs ráta; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease; N/A adat nem áll rendelkezésre; RAAS: Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer; T2DM: 2-es típusú diabetes mellitus. Az adatok átlag±SEM-ben vannak feltüntetve.

A CC genotípusú egyénekben a HbA_{1c} értéke szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a többi genotípushoz képest (p<0,001, 5.2.3.1. ábra). Az 5.2.3.2. ábra a HbA_{1c}-tercilisek alapján létrehozott csoportokban mutatja be a C allél frekvenciáját. Látható, hogy a rosszabb glikémás kontroll esetén a C allél gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb, vagyis a vizsgált polimorfizmus esetén a CC genotípus pozitív módon függ össze a szénhidrát-anyagcsere háztartással (p<0,05). Az 5.2.3.3. ábrán látható oszlopdiagram a diabétesz diagnózisakor megállapított életkort mutatja az egyes genotípusokban. Homozigóta C egyénekben a diabétesz szignifikánsan idősebb életkorban került diagnózisra és így diabétesz időtartamuk is rövidebb (p<0,05). Az 5.2.3.4. ábrán látható Box-and-whiskers diagrammon a diabétesz fennállásának időtartama látható a genotípusok szerint (p<0,05). A G900C polimorfizmus és a késői diabeteses szövődmények megjelenése között logisztikus regresszióval szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni (5.2.3.3. táblázat).

dc_360_19



5.2.3.1. ábra: A Box-and-whiskers diagram a HbA_{1c}-szinteket mutatja be genotípusok szerint. * p<0,001 vs. GC és GG



5.2.3.2. ábra A C allél frekvenciája a HbA_{1c}-tercilisek szerint. A bal oldali tengely az oszlopdiagramon feltüntetett tercilisek HbA_{1c} átlagát, a jobb oldali tengely a vonal diagrammon bemutatott, a tercilisekhez tartozó C allél frekvenciáját mutatja. A hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelzik. * p<0,05 vs. 3. tercilis.



5.2.3.3. ábra: A T2DM diagnózisakor megállapított életkor a genotípusok szerint. * p<0,05 vs. GG



5.2.3.4. ábra A T2DM fennállásának időtartama a genotípusok szerint. * p<0,05 vs. GG

5.2.3.3. táblázat Diabeteses mikrovaszkuláris szövődmények előfordulása a fruktózamin-3kináz enzim G900C polimorfizmusának genotípusai szerint és az esélyhányadosok a szövődmények kialakulása tekintetében

Mikrovaszkulárisszövődmé	G	Genotípusok Esély hár		Esély hányados	n ártál
nyek előfordulása (%)	CC	GC	GG	(95 % CI)	p-entex
Diabeteses nephropathia	27,3	33,1	30,5	0,796 (0,364-1,744)	0,569
Diabeteses neuropátia	43,7	32,5	31,3	1,754 (0,806-3,393)	0,170
Diabeteses retinopátia	25,0	22,8	19,9	1,213 (0,470-3,132)	0,690

CI, konfidencia intervallum

5.3. Inzulin-rezisztenciában a nem enzimatikus glikáció növeli vesében a renin pozitivitást (III)5.3.1. Bevezetés

A szénhidrát anyagcserezavar egyik korai fázisa a csökkent glukoztolerancia (impaired glucose tolerance (IGT). Ez az állapot a diabetes és a normális anyagcserehelyzet között helyezkedik el. A diabeteses betegekben évek, évtizedek alatt kialakulhat diabeteses nephropathia, és a hypertoniás (HT) betegek egy részében nephrosclerosis jön létre (205,206). A diabetes és a HT gyakran együtt fordul elő ugyanabban a betegben, és egymás káros hatásait erősítik. Ezekben a betegségekben a veseszövődmény patogenezise mindmáig nem ismert pontosan, de egyértelmű, hogy a korai betegségstádiumban elkezdett kezelés a vesefunkció romlását megállíthatja, lassíthatja, ideális esetben reverzibilissé teheti. Fentiek miatt kiemelkedően fontos az ezekben a betegekben kialakuló vesekárosodások legkorábbi elváltozásainak megismerése.

A vesében IGT állapotában kialakuló hisztomorfológiai eltérésekről adatok tudomásunk szerint nem ismeretesek. Ezért állatkísérletes anyagunkban (hím Wistar patkányokban) azt vizsgáltuk, hogy az egyidejűleg létrehozott IGT és hypertonia (IGT+HT) befolyásolja-e az AGE-imidazolon megjelenését és a renin expresszióját, lokalizációját, és azt, hogy ennek következtében kialakulnak-e morfológiai eltérések a vesében.

5.3.2. Módszerek

5.3.2.1. Állatok

A vizsgálatokhoz 32 felnőtt, hím Wistar törzsű laboratóriumi patkányt használtunk, melyek átlagos testtömege a kísérlet kezdetén 295,6 ± 11,5 g volt. Az állatokat egyedi ketrecekben helyeztük el, táplálék (száraz laboratóriumi patkánytáp ("pellets") Charles River Magyarország Kft.) és ivóvíz az egyes vizsgálatok közötti időszakban *ad libitum* állt rendelkezésükre. A patkánytartó helyiség megvilágítása a természetes fényhez közeli spectrumú volt, 12-12 órás sötét-világos periódusokkal, automatikus ciklusváltással (a villany reggel 07:00 órakor kapcsolódott fel). Az állandó hőmérsékletet $(21 \pm 2 \text{ °C})$ és páratartalmat (60 ± 5 %) klímaberendezés biztosította. A megfigyelések kezdetén a

patkányokat három, megközelítően azonos testtömeg-átlagú csoportba (intakt, "álműtött" kontroll (KO) és metilglioxállal kezelt (MGO) osztottuk. Az állattartási körülmények minden tekintetben megfeleltek az intézményi, országos és nemzetközi előírásoknak.

5.3.2.2. Műtét

Az operációkat ketamin (Calypsol, Richter G. Rt. Magyarország) és diazepám (Seduxen, Richter G. Rt., Magyarország) 4:1 arányú keverékével (0,2 ml / 100 tsg) biztosított teljes anesthesiában végeztük. Az állatok fejét stereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a koponyacsontról eltávolítottuk a bőrt, az izom- és kötőszöveti rétegeket, s a felszínt megszárítottuk. Micromanipulátorral (Narishige MM-33, Japán) az agyi ventromedialis hypothalamusnak (VMH) megfelelő stereotaxiás koordináták mentén (AP: Bregma + 0,2; ML: 1,0)¹⁷ kimértük a behatolás helyét, aztán fogászati fúróval mikroszkópos ellenőrzés mellett mindkét oldalon egy-egy 2-3 mm átmérőjű lyukat fúrtunk a koponyán. Az általunk előzetesen rozsdamentes acélcsőből készített vezetőkanül-párokat (steril injekciós tű /23G/, külső átmérő 0,6 mm) e nyíláson keresztül micromanipulátor segítségével a keményagyhártya felszínére ültettük. A kétoldali vezetőkanülöket fogászati acryláttal rögzítettük a koponyacsonthoz, majd desinficiálást és antibiotikus sebhintőpor helyi alkalmazását követően a bőrt az acrylát "korona" előtt és mögött összekapcsoltuk, végül a patkányokat visszahelyeztük ketreceikbe.

5.3.2.3. Mikroinjekció

A kísérletet egy héttel az operációk után folytattuk, akkor, amikor az állatok már felgyógyultak, s visszanyerték műtét előtti testtömegüket. Az anyagbeadásokhoz általunk előzetesen rozsdamentes acélcsőből (InterMedical Co., Japán, külső átmérő 0,3 mm) készített, a vezetőkanülökbe pontosan illeszkedő, 5-7 cm hosszúságú, vékony polietilén-toldalékkal (Hibiki 3, Japán) ellátott beadókanülöket használtunk. Ezek hosszát (9,25 mm) úgy alakítottuk ki, hogy a vezetőkanülön átvezetve végük pontosan a célterület, a VMH felső harmadába érjen. Az oldatokat – MGO (0,065 mM; Sigma-Aldrich Co., U.S.A.), ill. fiziológiás só (0,15 M NaCl) – oldalanként 1-1 µl térfogatban, infusiós minipumpában (Stoelting Co., U.S.A.) rögzített Hamilton-microfecskendők segítségével, 1 perc alatt juttattuk be az éber, kézben tartott állatok agyába. A mikroinjekciókat befejezvén egy percet vártunk, hogy az anyag a beadás helyéről eldiffundálhasson, valamint hogy a kihúzáskor képződő szívóhatás a localis adagot ne csökkentse, s csak ezután távolítottuk el a beadókanülöket.

Tizenhat patkány MGO-t kapott, az "álműtött" kontrollok közül 8-nak (ugyancsak intrahypothalamicusan) physiológiás sót adtunk az esetleges volumenhatás ellenőrzésére, míg 4 esetben a beadókanül célterületre juttatását anyagbeadás nem követte. Négy intakt állatot (melyeket az operációkor szintén elaltattunk) műtetlenül hagytunk meg az "álműtétek" esetleges nem kívánatos hatásainak ellenőrzése céljából.

5.3.2.4. Testtömeg, táplálék- és folyadékfelvétel

A műtét előtt és után, a kezelések illetve a magatartási kísérletek megkezdéséig patkánytáp és csapvíz szabadon állt az állatok rendelkezésére. Testtömegüket, táp- és folyadékfelvételüket naponta, analóg mérlegen, grammos pontossággal mértük. Az agyi mikroinjekciós kezelést, továbbá a különböző biokémiai-metabolikus teszteléseket (cukorterhelések, plazmaszint-meghatározások) és a táplálékfelvételi magatartási vizsgálatokat minden esetben 15 órás tápmegvonás előzte meg.

5.3.2.5. 'Orális' glukóz-tolerancia teszt (OGTT)

A cukorterhelés szájon keresztül a patkányok gyomrába vezetett polyethylen szondán (Hibiki 6, Japán) át beadott, csapvízben oldott D-glukóz (Reanal Finomvegyszergyár Rt., Magyarország) oldattal (0,75 g/ml/100 tsg) történt. A tesztet elvégeztük mind a vizsgálatsorozat kezdetén, az intracerebrális anyagbeadást 15 perccel követő ún. "akut", mind pedig a 4 héttel későbbi, ún. "krónikus" (subakut) időszakban. A vércukormérésekre farokvégből nyert vérből, Glucotrend típusú (Boehringer Mannheim, Németország), automatikus fotometriás rendszerű, digitális kijelzésű kézi mérőműszer segítségével a terhelést követő 9., 18., 30., 60. és 120. percben került sor. Az alap (ún. "éhomi") vércukor koncentrációkat a mikroinjekciót közvetlenül megelőzően vett mintákból állapítottuk meg.

5.3.2.6. Plazmakoleszterin-, -triglicerid- és –húgysav-koncentrációk mérése

E vizsgálatokhoz enzimatikus-kolorimetriás elven működő reagenskészleteket (Koleszterin-, Triglicerid- és Húgysav-kit; Diagnosticum Rt., Magyarország) használtunk. A leolvasás spectrophotometer készülékkel (Hitachi U-2001, Japán) történt.

5.3.2.7. Plazmainzulin- és -leptinszint mérések

A fenti módon előállított plazma-mintákból, specifikus patkány RIA kit-ek (RI-13K és WAK-R-LEP, LINCO Research Inc., U.S.A.) felhasználásával, meghatároztuk az inzulin és a leptin koncentrációját is. Az izotópos méréseket automatikus integrált áramkörös spectrométerrel a hozzá tartozó üreges mérőhelyen (NK-350 és NZ-138, Gamma Művek, Magyarország) végeztük. Az esetlegesen kialakuló inzulin-rezisztencia megállapítására HOMA-indexet számítottunk⁻

5.3.2.8. Táplálékfelvétel fiziológiás "kihívások"-ra

A kísérletsorozat 2-3. hetében, a kompenzációs szabályozási folyamatok épségének vizsgálatára a hypoglykaemiás állapot keltette táplálékfelvételt kétféle módon tanulmányoztuk. Inzulin (Insulin-S /400 NE, 10 ml/, Richter G. Rt., Magyarország) i.p. injekcióját (0,6 NE / 100 tsg, 0,15 M NaCl-lel hígítva az ampulla tartalmát) 2, 4 és 24 órával követően mértük a patkányok tápfelvételét. Az

egyes mérési időpontokban a korábban leírtaknak megfelelően vércukor-meghatározást is végeztünk. A hypoglykaemia másik módszer szerinti előidézését 2-deoxi-D-glukóz (2-DG; Sigma-Aldrich Co., U.S.A.) desztillált vizes oldatának i.p. injekciójával (75 mg/ml/100 tsg) értük el. A rövid- és hosszútávú hatások értékelésére az injekciót 2, 6 és 24 órával követően mértük az állatok tápfelvételét. A vizsgálatokat mindkét esetben a világos napszakban, délelőtt 9 órakor indítottuk.

5.3.2.9. Vérnyomásmérés

Az állatok vérnyomását szemiautomatikus módon mértük (LE 5001 PANLAB S.L. Spanyolország)

5.3.2.10. Statisztika

A minták homogenitásának eldöntéséhez F-tesztet alkalmaztunk. A kísérleti eredményeket többszempontos variancia-analízissel (ANOVA) és *t*-próbával értékeltük. Az adatok ábrázolásakor a középértéket (átlag) és annak hibáját (± SEM) tüntettük fel.

5.3.2.11. Morfológiai vizsgálat

5.3.2.11.1. Szövettan

Az állatokat nagy mennyiségű altatószer túladagolásával mélyen elaltattuk, majd előbb 250 ml fiziológiás só-oldattal, ezután 350-400 ml 4 %-os pufferezett formaldehid- és 0,5 %-os glutáraldehid oldattal transcardiális perfuziót végeztünk

5.3.2.11.1.1. Fénymikroszkópos vizsgálat

Mindegyik kísérleti állat agyát és mindkét oldali veséjét vizsgáltuk. Az intrahypothalamicus mikroinjekció pontos helyének azonosítására a fixálást követően kivettük a patkányok agyát, 60 µm-es sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket cresyl-violával festettünk meg. A mikroszkópos elemzés során a célzott agyterülettől (VMH) eltérő helyen azonosított kanülnyomok, illetve kiterjedt bevérzés, vagy egyéb sérülés esetén az adott állat eredményeit nem vettük figyelembe a kísérleti adatok értékelésekor.

A vese-kimetszéseket 4%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorozatban víztelenítettük és paraffinba ágyaztuk. A vesékből 3-5µm vékony metszeteket haematoxilin-eosinnal (HE) és Masson féle trikrómmal festettük meg, és PAS reakciót végeztünk.

5.3.2.11.1.2. Renin, AGE és endotél immunhisztológiai (IH) fénymikroszkópos vizsgálata

A fent leírt módon a formalinban fixált, paraffinba ágyazott veseszövetből 5 μm vékony metszeteket készítettünk és ezeket deparaffinálás után desztillált vízzel öblítettük. Ezt Pronase (DAKO) emésztés követte 15 percig 37°C-n. Az endogén peroxidáz gátlásra methanol:H₂O₂ 1:1 higitását használtuk 10

percig tartó inkubálással, majd phosphat buffer salinában (PBS) mostuk a metszeteket. Háttér gátlásra 1% bovin serum albuminban 20 perces időt alkalmaztunk. Primer monoclonalis antitestnek anti-patkány renint (1:50) (SWANT Bellinzona, Switzerland), anti-AGE-t 1:50 (Toshimitsu Niwa, Department of Clinical Preventive Medicine, Nagoya University, Daiko Medical Center, Nagoya, Japan), szívességből, és anti-endotélt (CD31, DAKO) 1:50 higításban használtunk, és egy éjszakán át, +4°C-on inkubáltunk. Ezt követően PBS-ben mostunk. Szekunder antitestnek En Visiont (DAKO) használtunk, 30 perces idővel, majd PBS mosás után az előhívást amino-ethylcarbasollal (AEC), vagy diaminobenzidinnel (DAB) végeztük. Magfestésre haematoxilint használtunk. A metszeteket glicerines zselatinnal fedtük le.

5.3.2.11.1.3. Immunhisztologiai fénymikroszkópos feldolgozás

A fent leírt módon perfuziós fixálás után azonnal a vesékből a kéreg és velőállomány, illetve célzottan a vesepapillák területét tartalmazó részeket vágtunk ki. Ezekből a szövetrészekből 80 µm vastagságú szeleteket metszettünk vibratommal (Technical Products Incorporation, St. Louis, MO, USA). Háromszor 15 perces 0,05M Tris pufferben (TB, pH 7,6) való mosás után a szabadon úszó metszeteket TB-ben higított lószerummal (1%) szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, majd a primer antiszérummal 4C°-on 3 napig rázógépen inkubáltuk. Primer antitestnek monoclonalis anti-patkány renint használtunk (Swant, Bellinzona, Switzerland, 1:5000), melyet TB tartalmú 0,4%-os Triton X-100-zal hígítottunk, hogy a penetrációt elősegítsük. A primer antitesttel való inkubálás után a metszeteket 3x15 percig TB-vel mostuk, majd biotinilált, pan-specifikus, TB-vel 1:50-es arányban hígított, univerzális, szekunder antiszérummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 2 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a metszeteket 3x15 percig TB-vel mostuk és avidin-biotinperoxidáz komplexszel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, 1:50) szobahőmérsékleten inkubáltuk. További TB-vel való mosás után az immunreakciót 3,3' diamino-benzidinnel (DAB) tettük láthatóvá (10 mg DAB 25 ml TB-ben (pH 7,4), melyhez közvetlenül használat előtt 15 µl 3%-os H₂O₂-t adtunk. A reakció folyamatát mikroszkóppal ellenőriztük, és a reakciót TB-vel (pH 7,6) állítottuk le. Az utolsó TB-vel történő mosás után a metszeteket tárgylemezre vittük és egy éjszakán át levegőn szárítottuk. Minden metszetet alkohollal víztelenítettünk, xilolban derítettünk, és DPX-szel (Mountant for histology, Fluka, Switzerland) fedtük le.

Az antiszérumok specificitását a gyártó ellenőrizte. Ezen kívül azokon a metszeteken, amelyeket a primer antiszérummal való kezelés nélkül dolgoztunk fel, nem láttunk jelölődést.

5.3.2.11.1.4. Immunelektronmikroszkópos vizsgálat

A "flat-embedding" módszert használtuk. A fixálás, metszés, valamint az immunhisztokémia a fent leírtak szerint történt. Az immun-jelöléssel sikeresen festődött metszeteket, a DAB-bal történő előhívás után először 2,5%-os glutáraldehidben fixáltuk. Egy órás fixálás után foszfát pufferbe (PB,

01M, pH 7.4) tettük, majd ezt 1 óra hosszú 1 %-os ozmium tetroxiddal való kezelés, majd PB-ben való mosás követte. Ezt követően a metszeteket 50-70-90-96 %-os alkoholban víztelenítettünk, melynek során a kontraszt fokozás érdekében uranyl-acetát 70%-os etanolban oldott 1%-os oldatával 1óra hosszan inkubáltuk a metszeteket. Utána 70 %-os alkohollal mostuk és 90-96%-os alkohollal 10-10 percig, majd 2xl5 percig abszolút alkoholban dehidráltunk. Ezután a metszetek 2x5 percre propilén-oxidba kerültek, ezután 30 percig a prolilén-oxid és a Durcupan műgyanta (ACM, Sigma) 1:1 arányú keverékbe, majd tiszta Durcupanban tartottuk az anyagot másnapig. A metszeteket ezután tárgylemezre tettük, és műanyag fedőlemezzel fedtük (Gröpl, Tulln, Austria). A műgyanta 24 óráig 56 C°-on polimerizálódott.

A metszetekben a reninnel pozitívan jelölődött sejtek osmifikációja lehetővé tette az érintett szövetterületek kiválasztását. Az immunjelöléssel pozitív részeket tartalmazó, jellemző területekről fénymikroszkópos felvételeket készítettünk, majd ezeket a területeket a metszetből kivágtuk és újra blokkoltuk Durcupan műgyantába, majd ultravékony sorozatmetszeteket vittünk egylyukú collodionbevonatú (Parlodion, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA.) rézgridre. Az ultravékony metszeteket uranyl-acetáttal és ólomcitráttal kontrasztosítottuk, standard eljárás szerint. A renin azonosítható az elektronmikroszkópos metszeteket JEOL 1200 EX-II elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

5.3.3. Eredmények

Megfigyeléseink, méréseink tanúsága szerint az álműtött patkányok minden vizsgálatban az intakt egyedekkel megegyező módon viselkedtek, így az MGO kezelések eredményeinek értékelésekor a kezeletlen kontroll csoporttal történő külön összehasonlításra nem volt szükség (azaz a statisztikai értékelésekben a 12 álműtött állat adataira támaszkodtunk).

5.3.3.1. Testtömeg, táplálék- és folyadékfelvétel

Bár a ventromedialis hypothalamusba juttatott MGO mikroinjekció nyomán időszakosan tapasztaltunk enyhe, a kontrollokénál kifejezettebb testtömeggyarapodást, a kísérlet folyamán a kezelt és a kontroll állatok között e tekintetben szignifikáns különbséget nem állapítottunk meg. A két patkánycsoport alap, azaz a magatartási és/vagy biokémiai tesztelések közötti napokon mért táp- és vízfelvétele ugyancsak nem tért el számottevően egymástól.

5.3.3.2. 'Orális' glukóztolerancia teszt (OGTT)

A cukorterheléses vizsgálatok mindkét állatcsoportban az éhomi vércukorszintek (akut, MGO vs KO /mmol/l/: 4,4±0,13 vs 4,47±0,09) fiziológiás tartománybeli voltát bizonyították, ugyanakkor, mind az akut, mind a krónikus időszakban, a MGO kezelt állatok glukóztoleranciájának kóros változásaira világítottak rá. Amint azt az 5.3.3.2.1. ábra alsó és felső grafikonpárjai egyértelműen

mutatják, az MGO VMH-ba juttatása nyomán, mindkét kísérleti ülésben, a vércukor-értékek a kontrollokéinál szignifikánsan magasabbra emelkedtek, elhúzódóbb, lassabb dinamikájú alapállapotba történő visszatérést eredményeztek, aminek következtében a kétórás szintek még mindig a pathológiás, "diabeteses" tartományban voltak.

Az akut tesztelés, vagyis az MGO beadást 15 perccel követő terhelés során a kezelt patkányok vércukorgörbéje a kontrollokénál később, 30'-nél tetőzött, s még a 120'-es érték is kóros volt (MGO vs KO /mmol/l/: <u>30'</u>, 8,49±0,46 vs 7,18±0,53; <u>60'</u>, 8,34±0,29 vs 6,92±0,44; <u>120'</u>, 8,18±0,53 vs 6,95±0,23; a mind az öt mérési időpontra /9., 18., 30., 60. és 120. perc/ és a teljes populációra vonatkozó ANOVA: csoportok p<0,001, *t*-próba: 30, 60 és 120 percnél egyaránt p<0,05).

A "krónikus" ülésben, azaz az agyi mikroinjekció után 4 héttel elvégzett glukóz-tolerancia teszt eredménye az elsőhöz hasonló volt, s ez a lokálisan adott MGO elhúzódó, tartós szénhidrátanyagcsere-zavart okozó hatását igazolta. Az MGO-kezelt állatok vércukor értékei - már a 18. perctől kezdődően a kontroll adatoknál magasabbnak bizonyultak. (MGO vs KO /mmol/l/: <u>18</u>', 8,65±0,29 vs 6,75±0,39; <u>60</u>', 8,87±0,69 vs 7,2±0,31; <u>120</u>', 8,48±0,59 vs 7,15±0,35; a mind az öt mérési időpontra /9., 18., 30., 60. és 120. perc/ és a teljes populációra vonatkozó ANOVA: csoportok p<0,001, *t*-próba: 18' p<0,001, 60' p<0,005 és 120' p<0,05)

dc_360_11





5.3.3.2.1. ábra: Metilglioxál kiváltotta kóros glukóz-tolerancia a kísérlet akut (felső panel) és krónikus (alsó panel) időszakában. Abszcissza, a cukorterhelés időskálája (perc); ordináta, a vércukor-értékek (mmol/l). MGO, metilglioxál kezelt állatok (n=8); KO, álműtött kontrollok (n=8). *, akut: 30., 60., 120. perc, p<0,05; krónikus: 18. perc, p<0,001, 60. perc, p<0,005, 120. perc, p<0,05; t-próba.

5.3.3.3. Plazmakoleszterin-, -triglicerid- és -húgysav-koncentrációk mérése

A kísérletek utolsó stádiumában (3-4 héttel a VMH-ba adott mikroinjekciók után) nyert vérmintákból elvégzett plazmametabolit-szint meghatározások eredményei azt igazolták, hogy a MGO kezelés az anyagcsere-egyensúly tartós felborulását idézi elő. A 5.3.3.3.1. ábra oszlopdiagramjai mindhárom mért metabolit esetében anyagcserezavar fennálltát szemléltetik (koleszterin /mmol/l/,

MGO vs KO: 2,22±0,25 vs 1,69±0,06, *t*-próba, p<0,05; triglicerid /mmol/l/, MGO vs KO: 0,66±0,09 vs 0,54±0,02, *t*-próba, p=0.07; húgysav /µmol/l/, MGO vs KO: 159,14±13,11 vs 102,26±3,57, *t*-próba, p<0,005).







5.3.3.3.1. ábra: Az MGO kezelés dyslipidaemiát és húgysavemelkedést idéz elő. Abszcissza, csoportok (mindkét esetben n=5); ordináta, plazma-szintek (mmol/l /koleszterin, triglicerid/ és µmol/l

/húgysav/). Rövidítések: KO= kontroll, MGO=metilglioxállal kezelt csoport, *, koleszterin, p<0,05,húgysav, p<0,005, t-próba.

5.3.3.4. Plazmainzulin- és -leptinszint mérések

Az anyagcsere változások humorális hátterének jobb megvilágítása érdekében, hasonlóan a metabolit-meghatározásokhoz, az agyi anyagbeadások (MGO, vagy vehikulum mikroinjekciója, tehát 'álműtét') utáni 3-4. héten nyert vérmintákból plazmainzulin- és leptin-koncentráció mérésekre is sor került. E vizsgálataink leleteit az 5.3.3.4.1. ábra oszlopdiagramjai mutatják be. Jól látható, hogy az MGO-kezelt patkányok esetében az inzulin-koncentrációk éppen a szignifikancia határig emelkedtek, míg a leptinszintek a kontrollokéinál lényegesen magasabbnak bizonyultak (inzulin /µg/l/, MGO vs KO: 0,85±0,14 vs 0,59±0,11, *t*-próba, p=0,06; leptin /µg/l/, MGO vs KO: 2,66±0,29 vs 1,96±0,30, *t*-próba, p<0,05). Ún. HOMA-érték számításaink arra világítottak rá, hogy az MGO mikroinjekciója nyomán inzulin-rezisztencia fejlődik ki (MGO vs KO: 4,88±1,13 vs 2,82±0,51, *t*-próba, p<0,05).





5.3.3.4.1. ábra: MGO kiváltotta plazmainzulin- és -leptin-koncentráció változások. Abszcissza, csoportok (mindkét esetben n=9); ordináta, plazma-szintek (μ g/l). A rövidítések megegyeznek az előző ábráéval. *, p<0,05, t-próba.

5.3.3.5. Vérnyomásmérések

Az MGO-val kezelt állatokban 4 héttel a mikroinjekció után a vérnyomás szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban (szisztolés vérnyomás: $134,5 \pm 7,0$ vs. $112,2 \pm 4,9$ Hgmm, p<0,05; diasztolés vérnyomás : $97 \pm 5,7$ vs. $78,6 \pm 11,6$ Hgmm, p < 0,05).

5.3.3.6. Szövettan

A ventromedialis hypothalamusba adott mikroinjekció, illetve a kanül-nyomok helyének azonosítására elvégzett fénymikroszkópos szövettani elemzések 3 MGO kezelt és 2 álműtött állatban a célterületen kívüli localisatiót igazoltak. További egy kontroll patkány esetében a vezetőkanül alatti kéregterületen kiterjedt bevérzést állapítottunk meg. A fenti 6 egyed adatait az eredmények értékelésekor nem vettük figyelembe.

5.3.3.7. Fénymikroszkópos, fénymikroszkópos immunhisztokémiai és immunelektronmikroszkópos észlelések a vesékben.

A vesében a patológiás elváltozások az arteriolák, a glomerulusok és a papilláris TI szintjén is megjelentek.

5.3.3.7.1. Fénymikroszkóp

Az MGO-val kezelt állatokban az afferens-efferens nagyságrendű arteriolák fala erősen kiszélesedett, ugyanitt PAS pozitív homogen anyag lerakódása, részben szemcsézettség jött létre az érlumenek változó szűkületével (5.3.3.7.1.1. ábra). Ezek az elváltozások ugyanazon glomerulus afferens és efferens arteriolájában is észlelhetőek voltak.



5.3.3.7.1.1. ábra A vese arteriola fal kiszélesedett és PAS pozitív homogenizációt mutat (nyíl) az MGO kezelt IGT+HT csoportban. PAS reakció, 400x

Az MGO-val kezelt patkányok papilláris területének intersticiumában változó súlyosságú fibrosis alakult ki (5.3.3.7.1.2. ábra A panel), míg a kontroll csoportban nem mutatkozott kóros eltérés

(5.3.3.7.1.2. ábra B panel). A kéregállomány interstitiumában kóros elváltozást egyik csoportban sem észleltünk (ábrán nem mutatjuk).



5.3.3.7.1.2. ábra Fibrosis a vesepapillában. A: Kék szín jelzi a kötőszövet felszaporodását Masson trikróm festés, 400x. **B:** Kontroll: fibrosis nem látható. Masson trikróm festés, 400x.

5.3.3.7.2. Fénymikroszkópos immunhisztokémia

Az arteriolák falában FM-IH-val kiterjedt renin pozitivitást észleltünk (5.3.3.7.2.1. ábra).



5.3.3.7.2.1. ábra: Renin akkumuláció a vese arteriolában (nyíl). Immunhisztokémia, anti-reninnel. Barna szín jelzi a renin pozitivitást. **A**: 200x. **B**: 400x.

Az MGO kezelt és kontroll patkányok veséinek papilláris területében az endoteliális sejtek CD 31-el jelölődtek (5.3.3.7.2.2. ábra A panel). Az MGO kezelt állatokban endotél rajzolattal megegyezően renin (5.3.3.7.2.2. ábra B panel), és az AGE-imidazolon pozitivitás jelent meg (5.3.3.7.2.2. ábra C panel).

dc_360_11



5.3.3.7.2.2. ábra: Kapilláris endotéliális sejt jelölődés, renin és imidazolon pozitivitás a vese papilláris területében. A: Kapilláráris endotéliális sejt jelölődése. Immunohisztokémia anti-CD 31-el. Vörös szín jelzi a pozitivitást, 200x. **B**: Renin pozitivitás: immunohisztokémia anti-reninnel. Vörös szín jelzi a pozitivitást, 200x. **C**: Imidazolon pozitivitás a vese papilláris régiójában, immunohisztokémia anti-imidazolonnnal, vörös szín jelzi a pozitivitást, 200x. Az A ábrán látható endotél rajzolattal megegyező a renin (B), és imidazolon (C) immunohisztokémiai megjelenése.

Szintén renin és imidazolon jelent meg az MGO kezelt állatok glomerulusainak mezangiális területében. Ugyanezen lokalizációkban a kontroll csoportban – az arteriola falában észlelt renin pozitivitástól eltekintve – sem renin, sem AGE-imidazolon nem volt látható (5.3.3.7.2.3. ábra).



5.3.3.7.2.3. ábra: Renin és imidazolon pozitivitás az MGO kezelt (IGT+HT) és kontroll csoport veséiben. A: Renin pozitivitás a glomerulus mezangiális területében és az arteriola falában. Immunhisztokémia anti-reninnel, barna szín jelzi a pozitivitást, 200x. **B:** Imidazolon-AGE pozitivitás a glomerulus mezangiálisterületében és az arteriola falában. Immunhisztokémia anti-imidazolonnal, barna szín jelzi a pozitivitást, 200x. **C:** Kontroll csoport: renin pozitivitás az arteriola falában. A glomerulusban nem látható pozitivitás. Immunhisztokémia anti-reninnel, 200x.

5.3.3.7.3. Immunelektronmikroszkópos vizsgálatok

Az MGO-val kezelt patkányokban renin pozitivitás jelent meg a peritubuláris kapilláris endotélben, míg a kontroll állatokban ez nem volt észlelhető (5.3.3.7.3.1. ábra).

dc_360_11



5.3.3.7.3.1. ábra: Renin pozitivitás a peritubuláris kapilláris endotélsejt rétegében. A: Nyíl jelzi a renin pozitivitást CL=kapilláris lumen, TC=tubuláris sejt. Immuno-elektronmikroszkópia antireninnel, fekete szín jelzi a pozitivitást. Bar= 2 mikrométer B: Az "A" ábrával megegyező elváltozás, nagyobb nagyítással.Bar= 200 nanométer C: Kontroll csoport: Renin pozitivitás nem látható. Bar= 2 mikrométer. EC= endotéliális sejt, többi jelölés, mint A. ábránál

5.4. Vizsgálatok diabeteses nephropathiában (O-glikoziláció, IV, V, L)

Rövidítések

AGE: nem-enzimatikus glikációs végtermék, advanced glycation endproduct, eNOS: endotéliális nitrogénmonoxid szintáz, ESRF: end stage renal failure, végstádiumú veseelégtelenség, GFAT: glutamin: fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz, GlcN: glukózamin, HbA_{1c}: hemoglobin A_{1c}, HBP: hexózamin bioszintézis anyagcsereút, hexosamine biosynthesis pathway, OGA: N-acetilglukózaminidáz, OGT: uridin difoszfát-N-acetilglukózamin traszferáz, PAI-1: plazminogén aktivátor inhibítor-1, PKC: protein kináz C, TGFβ: transzformáló növekedési faktor β, UDP-GlcNAc: uridin 5'-difoszfát N-acetilglukózamin, ZDF: Zucker Diabetic Fatty

5.4.1. Bevezetés

A diabetes mellitus és szövődményeinek kialakulásában és progressziójában több tényező is szerepet játszik, ezek közül az egyik legfontosabb a glukotoxicitás. Brownlee és mtsai közleménye alapján négy különböző mechanizmus tehető felelőssé a diabeteses glukotoxicitás kialakulásáért (207). Ilyen a fokozott aktivitású poliol anyagcsereút, a nem enzimatikus glikációs végtermékek (AGE)

fokozott képződése és felszaporodása, valamint a fokozott protein kináz C (PKC) aktivitás, illetve a megnövekedett hexózamin anyagcsereút (hexosamine biosynthesis pathway, HBP) és a következményesen megnövekedett O-glikoziláció [2, 3], amelyeket a következő ábra szemléltet (5.4.1.1. ábra).



Poliol anyagcsereút-aktiváció



Több munkacsoport tanulmányai azt bizonyítják, hogy mind a fokozott HBP, mind a megnövekedett O-glikoziláció fontos szerepet tölt be a diabetes mellitus és szövődményeinek patogenezisében és a betegség progressziójában.

Hexózamin anyagcsereút

A sejtekbe beáramló glukóz mennyiségének mintegy 2-5%-a halad keresztül a HBP-n (208). A HBP-n átáramló glukóz mennyiségét a glutamin-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) határozza meg, ami a kulcsenzime a HBP-nek. A GFAT glukózamin-6-foszfáttá alakítja a fruktóz-6-foszfáttot, glutamint használva az aminocsoport forrásaként (5.4.1.2. ábra) (209).



5.4.1.2. ábra A hexózamin anyagcsereút és az O-glikoziláció. Rövidítések: Glc-6-P: glukóz-6-foszfát, Fru-6-P: fruktóz-6-foszfát, GlcNAc: N-acetilglukózamin, GlcNH₂-6-P: glukózamin-6-foszfát, GlcNAc-6-P: N-acetil-glukózamin-6-foszfát, UDP-GlcNAc: uridin 5'-difoszfát N-acetilglukózamin, UDP: uridin 5'-difoszfát, DON: 6-diazo-5-oxonorleucin, GFAT: glutamin-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz, OGT: uridin difoszfát-N-acetilglukózamin transzferáz, OGA: N-acetilglukózaminidáz, PUGNAc: O-(2-Acetamido-2-deoxi-D-glukopiranozilidén) amino N-fenil karbamát.

Az anyagcsereút végterméke az uridin 5'-difoszfát-N-acetilglukózamin (UDP-GlcNAc), ami a szubsztrátja a bazálmembrán töltését megadó proteoglikánok szintézisének a Golgi apparátusban, csakúgy, mint a sejtmagban és a citoplazmában megtalálható fehérjék szerin vagy treonin aminosavainak egyetlen N-acetilglukózaminnal való poszttranszlációs módosulásának, azaz O-glikozilációjának.

Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányokból, mely egy a 2-es típusú diabetes mellitus tanulmányozására szolgáló állatkísérletes modell, emelkedett UDP-GlcNAc koncentrációt mutattak ki a kontroll állatokhoz képest (210).

McClain munkacsoportja humán vizsgálatban is bizonyította a HBP szerepét diabetes mellitusban (211).

Srinivasan és munkatársai tanulmányukban megállapították, hogy a diabeteses csoportban a GFAT aktivitása és génexpressziója szignifikánsan magasabb a kontroll csoporthoz képest, valamint erős korrelációt írtak le a GFAT aktivitás és a HbA_{1c} szintje, valamint a posztpradialis glukóz közt (212).

A fent említett vizsgálatok alátámasztják azt a feltételezést, hogy a diabetes mellitus növeli a HBP-n keresztül metabolizálódó glukóz mennyiségét, illetve hogy a HBP-n átáramló glukóz mennyisége fontos szerepet játszik az inzulin-rezisztencia és a glukotoxicitás kialakulásában.

O-glikoziláció

Az UDP-GlcNAc – a HBP végterméke – szolgál szubsztrátként az O-glikozilációhoz. Az Oglikoziláció a magasabbrendű eukariótákban mindenütt előforduló poszttranszlációs fehérjemódosulás, mely fontos szerepet játszik a sejtek szabályozó folyamataiban (213). Az O-glikoziláció a sejtmagban és a citoplazmában történik.

A legfontosabb különbség az O-glikoziláció és a nem enzimatikus glikáció között az, hogy a nem enzimatikus glikáció katalizáló enzim nélkül az O-glikoziláció pedig enzimatikus katalízis révén történik. Az O-glikozilációt két kulcsenzim szabályozza, az uridin difoszfát-N-acetilglukózamin traszferáz (O-GlcNAc transzferáz, OGT), mely az O-glikozilációt katalizálja és az N-acetilglukózaminidáz (O-GlcNAc-áz, OGA), mely a cukorrész eltávolításáért felelős (5.4.1.2. ábra) (213).

Hasonlóan a foszforilációhoz az O-glikoziláció is nagymértékben dinamikus, poszttranszlációs módosulás, azonban szemben a több száz kinázzal itt csak egyetlen enzim – az OGT - szabályozza ezt a reakciót. Több fehérjéről is bebizonyították, hogy reciprok foszforilálódás és O-glikozilálódás is előfordul. Ilyen például az eNOS (endotéliális nitrogén-monoxid szintáz) (214).

Jelen ismereteink szerint több mint 200 különböző fehérjéről igazolták, hogy O-glikozilált lehet (215). Az O-glikoziláció befolyásolja többek közt a fehérjék féléletidejét (216), enzimaktivitásukat (217), a fehérjék közti kapcsolat erősségét (218) és az intracelluláris elhelyezkedésüket (219).

Több, összefoglaló közlemény taglalja az O-glikoziláció szerepét diabetes mellitusban és a szövődményeinek létrejöttében (220-223). A rendelkezésre álló bizonyítékok zöme sejtkultúrán, vagy állatkísérletes modelleken alapul, azonban humán tanulmányok is vizsgálták az O-glikoziláció szerepét diabetes mellitusban.

A diabeteses nephropáthia kapcsolata a hexózamin anyagcsereúttal és az O-glikozilációval

Kolm-Litty és mtsai tanulmányai alapján igazolt, hogy az emelkedett glukózszint dózisfüggően gátolta disznó mesangiumsejtek szaporodását, és növelte a fibronectin expresszióját, azonban ehhez a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β) de novo szintézise elengedhetetlen volt. Ugyanez a munkacsoport demonstrálta, hogy mind az emelkedett glukóz szint, mind a glukózamin (GlcN) alkalmazása, megemelve a HBP termékeinek koncentrációját, fokozta a fibronectin, illetve a proszklerotikus TGF- β termelését. Az alkalmazott GFAT-inhibítor gátolta a hyperglykaemiának a HBP-re illetve a mátrix proteinekre gyakorolt hatását és a vártnak megfelelően hatástalan volt a GlcN esetében, ugyanis a GlcN megkerülve a GFAT-ot akadálytalanul fokozza a HBP-t (224). A GFAT fokozott expressziója normál glukózkoncentráció mellett is megnövelte a TGF- β és fibronectin expresszióját mezangium sejtekben, illetve megemelte a TGF- β receptorok mRNS szintjét is (225,226).

A plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1), amely gátolja a szöveti plazminogén aktivátort és az urokinázt, szintén fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix felszaporodásában, Scholey csoportja kimutatta, hogy a a PAI-1 promóter aktivitását a hyperglykaemia dózisfüggően emelte, és GFAT-inhibítorral sikerült blokkolni a hyperglykaemia hatását a PAI-1 promóterre (226).

Hsieh és munkatársai tanulmánya során immortalizált proximális tubulushámsejtekben a HBP aktivációja mind hyperglikémiával, mind glukózaminnal fokozta az angiotensinogén és a renin mRNS expresszióját, és sejthipertróphiához vezetett. Egy GFAT-gátló (azaserin) sikeresen megakadályozta a magas glukózszint hatását, azonban a GlcN esetében hatástalannak bizonyult, tovább erősítve a hipotézist, hogy a HBP lehet felelős, legalábbis részben, az intrarenalis RAS-rendszer aktiválásáért diabeteszben, és ezen a módon vezethet fokozott extracelluláris mátrix-felszaporodásához (227).

Humán vizsgálatuk során Nerlich és mtsai kimutatták, hogy emberi szövetekben is megtalálható a GFAT, mely a kulcsenzime a HBP-nek. Eltérő expressziót találtak azonban a különböző szövetekben. Kifejezett GFAT-pozitivitást mutatott a harántcsíkolt izom, a szívizom, a zsirsejt és a vesetubulus hámsejtjei is. Egészséges egyének mintájában nem sikerült GFAT pozitivitást kimutatni glomerulusokban, mely eredmény alapján felmerül, hogy az enzim csak alacsony koncentrációban van jelen. Diabeteses nephropáthiás betegekből vett mintákban a glomeruláris sejtek 10 esetből 7-szer pozitív jelölést adtak a GFAT ellenes antitesttel. Pozitív festődést a cukorbetegek glomeruláris epithelsejtjeiben és a mesangiumsejtekben találtak (228).

5.4.2. Módszerek

Csoportok: Vizsgálatainkhoz 6 diabeteses, illetve kontrollként 7 nem diabeteses beteg formalin fixált, paraffinba ágyazott vesebiopsziás mintáját használtuk. A nem diabeteses betegek szövettani diagnózisa vékonybazálmembrán syndroma volt. A két csoport között a plazmaglukóz és a

szérumkoleszterin tekintetében volt csak különbség, az egyéb klinikai paraméterek szempontjából hasonlóak voltak. A vizsgálatok a Regionális Etikai Bizottság engedélyével történtek.

Anyagok: A kísérleteinkhez használt O-glikozilációra specifikus monoklonális antitest (CTD110.6) Dr. Mary-Ann Accavitti (University of Alabama at Birmingham, Division of Genetic and Translational Medicine) ajándéka volt. A blokkoláshoz használt N-acetyl-D-glucosamine-t a SIGMA-Aldrich-től szereztük be.

Immunhisztológia: A humán vesebiopsziás anyagot formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk. A 3 µm-es metszeteket silanizált tárgylemezre húztuk. Az antigénfeltárást citrát pufferral (pH: 6,0) végeztük. Endogén gátlás és háttér gátlás után CTD110.6 antitestet 1:100 higításban alkalmaztuk egy éjszakán át, +4 °C-on. Gátlás: 20 mmol/L N-acetyl-D-glucosamine-nal (min 99%) higítva. Detektálás: UltraVision Dako. Chromogén: DAB (Dako). Felülfestésre haematoxilint használtunk. A metszeteket Permount-tal fedtük le.

Számolás és mérés a statisztikai kiértékeléshez: A számszerű méréseket két gyakorlott nefrológus végezte, akik nem tudták, hogy kinek a mintáit analizálják. Összesen 10 látótérben megszámolták a glomeruláris sejtek és a tubulusok számát. Nukláris vagy citoszolikus pozitivitásról akkor volt szó, ha a barnás CTD 110.6 festődés megjelent. Ezután az összes glomeruláris sejt/pozitív sejt és az összes tubulus/pozitív tubulus hányados került kiszámolásra. Ezen kívül komputerizált meghatározást is végeztünk, melynek során a minták digitális képein a színfelismerésre képes Adobe Photoshop segítségével a vizsgálandó barna színt feketére konvertáltuk, és a Scion Image program segítségével a fekete területek arányát a csoportok között összehasonlítottuk.

5.4.3. Eredmények:

Elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a humán veseminták O-glikozilációra pozitív jelölést adnak (5.4.3.1. és 5.4.3.2. ábra). A vizsgált metszetekben fokozott pozitivitást találtunk cukorbetegek vesetubulus hámsejtjeinek magjában, valamint a citoplazmájában, sőt a citoplazmában granuláris jelölődés is kimutatható volt (5.4.3.1. ábra). Ugyancsak fokozott pozitivitás volt igazolható a glomeruláris podocytákban (5.4.3.2. ábra).


5.4.3.1. ábra: Kontroll személyek és diabeteses betegek vesetubulusainak reprezentatív anti-Oglikozilációja (CTD110.6). A képeken látható barna jelölődés mutatja az O-glikozilációt, míg a kék szín a magfestést. Az ábrán látható vörös nyilak jelölik a granulált anti-O-glikoziláció festődést a diabeteses beteg vesetubulus-hámsejtek citoplazmájában (A és B panel). Az átlagolt eredmények (kontroll n=7 illetve diabetes n=6) a C és a D panelen láthatók. A Scion Image program felhasználásával készült átlagokat az E panel mutatja. * = p < 0,05.



C Staining of control and diabetic glomeruli

B Diabetic glomerulus



D Staining of control and diabetic glomeruli by measuring it with Scion Image program.



5.4.3.2. ábra Kontroll személyek és diabeteses betegek glomerulusainak reprezentatív anti-Oglikozilációja (CTD110.6). A diabeteses betegek glomerulusainak anti-O-glikoziláció (barna jelölődés) immunfestése (B panel) kifejezettebb volt, mint a kontrolloké (A panel). Az átlagolt eredményeket (kontroll n=7, diabetes n=6) a C panel és a Scion Image felhasználásával nyert adatokat a D panel mutatja. * = p < 0.05. Ábránkon jól látható a diabeteses beteg mintájában a glomerulus hypertrophiája. (a képek azonos nagyításban készültek)

Összehasonlítva a diabeteses és nem diabeteses betegek mintáit, fokozott granuláris festődést találtunk a diabeteses egyének vesetubulus hámsejtjeinek citoplazmájában a nem diabeteses egyének mintáihoz képest (5.4.3.1. ábra, a különbség a két csoport között mindkét számolási módszerrel szignifikánsnak bizonyult, p<0,05). Hasonló eredményekre jutottunk a glomeruláris pozitivitást illetően is (5.4.3.2. ábra).

Immunhisztológiai módszerünk specifikusságát vizsgálva, 20 mmol/l-es koncentrációjú Nacetilglukózamin oldatot használva teljesen blokkolni sikerült az elsődleges antitest kötődését.

5.5. Vizsgálatok IgA nephropathiában (VI, VII)5.5.1. Bevezetés

Az IgA nephropathia (IgANP) a leggyakrabban előforduló glomerulonephritis forma. A betegek 20-50 %-ában végállapotú veseelégtelenség (ESRD) fejlődik ki 20 évvel a diagnózis felállítása után (229,230) és ezért bír rendkívüli jelentőséggel az IgANP progresszióját befolyásoló tényezők vizsgálata és identifikálása.

Az IgANP korai stádiumaiban nem ritkán inzulin-rezisztencia és hiperinzulinémia mutatható ki (231,232) és gyakori az IgANP, a hypertonia és a diabetes mellitus együttes előfordulása is (233). Nincs azonban adat az összes szénhidrátanyagcsere-eltérés (emelkedett éhomi vércukor, csökkent glukóztolerancia, diabetes mellitus) együttes előfordulásáról IgANP-ban, és ezek hatásáról a glikációt és az oxidatív stresszt illetően.

Ezért a célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk IgANP-ban a nem-enzimatikus glikáció mértékét (keringő fluoreszcens AGE, és CML), valamint az oxidatív stressz alakulását a tiobarbitursav-reaktiv szubsztanciák (TBARS) meghatározása révén.

5.5.2. Betegek és módszerek

Nyolcvannyolc biopsziával igazolt IgANP-ás beteget vontunk be a tanulmányba. A betegek klinikai adatait az 5.5.3.1.1. táblázat foglalja össze. A másodlagos IgA depoziciót mutató betegeket (alkoholos cirrhosis, Schönlein-Henoch purpura, SLE, stb.) kizártuk a tanulmányból. A vizsgálatot a Pécsi Regionális Kutatás-Etikai Bizottság engedélyezte, és a résztvevők minden esetben beleegyező nyilatkozatot adtak.

A vizsgálat végzésekor, vagy előtte legalább egy évvel steroid kezelésben nem részesültek a betegek. Hatvanhat beteg (70,5 %) antihipertenziv kezelésben és egyszerre sószegény diétában részesült.

A betegeket két csoportra osztottuk vesefunkciójuk alapján. Azok a betegek, akiknek normál vesefunkciójuk volt (kreatinin clearance 106±22 ml/perc, átlag±SD, n=54), képezték az egyik csoportot, a másikat pedig a csökkent vesefunkciójúak (kreatinin clearance 51±19 ml/perc, n=34). A kontroll csoportot 62 egészséges önkéntesből állt, akiknek normális vesefunkciójuk volt (kreatinin clearance 102±24 ml/perc, 18 nő, 44 férfi, kor: 32±11 év).

A glukózanyagcsere állapotát standard orális glukóz tolerancia teszttel mértük fel (OGTT). A diagnózist az Amerikai Diabetes Társaság ajánlása alapján állítottuk fel (American Diabetes Association, (188). Normál glukóztoleranciáról (NGT) beszéltünk, ha az éhomi plazmaglukóz, FPG < 5,6 mmol/l és a 2-órás plazmaglukóz az OGTT során <7,8 mmol/l. Csökkent glukóztoleranciáról (IGT) beszéltünk, ha az FPG < 5,6 mmol/l és a 2 órás plazmaglukóz az OGTT során > 7,8 mmol/l de < 11,1 mmol/l. Emelkedett éhomi plazmaglukózról (IFG) beszéltünk, ha az FPG 5,6-6,9 mmol/l. Diabetes mellitusról (DM) beszéltünk, ha az FPG > 7,0 mmol/l és/vagy a 2-órás plazmaglukóz > 11,1

mmol/l, vagy ha a betegnek orális antidiabetikummal vagy inzulinnal kezelt, ismert diabetes mellitusa volt. Ezek alapján 21 betegnek volt IGT-je, IFG-je vagy DM-e.

Az AGE-FL mérése 50-szeres hígítású plazmából történt Hitachi F-4500 fluoriméterrel 370 nm-es excitációs és 440 nm-es emissziós hullámhossznál. A résszélesség 10 nm volt mindkét esetben, az eredményeket önkényes egységben (ö.e.) adtuk meg.

Az oxidatív stressz mérésére a TBARS módszerét használtuk, fluoreszcens méréssel történt a meghatározás (excitáció: 532 nm, emisszio: 553 nm), a Jentzsch és mtsai által leírt módszerrel (234).

A CML mérése az 5.1.2.2. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

A vesefunkció mérésére szérumkreatinin-meghatározást és kreatinin clearance-becslést (Cockroft-Gault formula szerint) használtunk.

Statisztikai kiértékelésre ANOVA-t használtunk (korra és kreatinin clearance-re korrigált értékekkel dolgoztunk, mert a betegek és az egészséges kontrollok között szignifikáns különbség volt ebből a két szempontból. Összefüggés-vizsgálatra parciális korrelációt használtunk, minden esetben korra korrigálva). Az SPSS statisztikai program 10.0 verzióját használtuk. Szignifikánsnak a p<0,05-t vettük és az adatokat átlag ±SD formában adtuk meg.

5.5.3. Eredmények

5.5.3.1. Oxidatív stressz- és AGE-paraméterek a vesefunkció függvényében

A plazma TBARS magasabb volt az IgANP-ás normális és csökkent vesefunkciós csoportban, mint az egészséges kontrollokban (p<0,001, 5.5.3.1.1. táblázat). A normális vesefunkciójú IgANP-ás betegekben nem volt magasabb a szérum AGE-FL és a CML, mint a kontroll csoportban, de a csökkent vesefunkciójú IgANP-ás betegek szérum AGE-FL és CML-szintje magasabb volt, mint a kontrolloké és a normális vesefunkciójú IgANP-ásaké (5.5.3.1.1. táblázat).

		IgA nephropat				
	1	2	3	⁻ 1 vs. 2	1 vs. 3	2 vs. 3
	Kontroll	Normális	Csökkent	р	р	р
	N=02	vesefunkció n=54	vesefunkció n=34			
Férfi/nő	44/18	36/18	21/13	N.S.	N.S.	N.S.
Kor (év)	32,1±11,5	40,5±12,3	48,6±12,7	<0,001	<0,001	0,006
Kreatinin clearance	102,3±24,3	106,3±21,6	50,5±19,3	N.S.	<0,001	<0,001
(ml/perc)						
Szérumkreatinin	91,9±12,4	84,9±15,9	190,9±136,1	N.S.	=0,001	<0,001
(µmol/l)						
AGE-FL (ö.e.)	1770±521	2026 ± 704	2659±958	N.S.	=0,001	=0,005
CML (ng/ml)	396±107	439±137	563±215	N.S.	<0,001	=0,002
TBARS (µmol/l)	0,44±0,26	1,00±0,62	1,16±0,61	<0,001	<0,001	N.S.

5.5.3.1.1. táblázat A kontroll csoport és az IgA nephropathiás betegek klinikai és oxidatív stressz, valamint szérum AGE-pareméter adatai.

AGE=előrehaladott glikációs végtermékek, CML=karboximetil-lizin, TBARS=tiobarbitursav-reaktív szubsztanciák.

5.5.3.2. Oxidatív stressz és AGE-paraméterek a szénhidrátanyagcsere függvényében

Az AGE-paraméterek (AGE-fluoreszcencia, CML) nem különböztek az eltérő szénhidrát anyagcseréjű csoportok között. A plazma TBARS-értékek mindkét IgANP-ás csoportban magasabbak voltak, mint a kontroll csoportban, de a különböző szénhidrát-anyagcseréjű IgANP-ás csoportok nem különböztek egymástól (5.5.3.2.1. táblázat).

5.5.3.2.1. táblázat A kontroll csoport és az IgA nephropathiás betegek oxidatív stressz és szérun
AGE-pareméter adatai a szénhidrátanyagcsere-státuszuk szerint.

		IgA nephropathi				
	1	2	3	1 0	1 0	
	Kontroll n=62	Normális szénhidrát anyagcsere n=67	IGT, IFG vagy DM N=21	1 vs. 2 p	1 vs. 3 p	2 vs. 3 p
AGE-FL (ö.e.)	1770±521	2239±916	2351±677	N.S.	N.S.	N.S.
CML (ng/ml)	396±107	487±176	487±199	N.S.	N.S.	N.S.
TBARS (µmol/l)	0,44±0,26	1,04±0,61	1,12±0,66	<0,001	<0,001	N.S.

IGT=csökkent glukóz tolerancia, IFG=emelkedett éhomi plazmaglukóz, DM=diabetes mellitus, AGE=előrehaladott glikációs végtermékek, CML=karboximetil-lizin, TBARS=tiobarbitursav reaktív szubsztanciák.

5.5.3.3. Korrelációk az AGE-paraméterek és a vesefunkció között

A teljes betegcsoportot figyelembevéve (n=88) és korra korrigálva az adatokat, szignifikáns korrelációt találtunk a számított kreatinin clearance és az AGE-FL, valamint a CML között (5.5.3.3.1. ábra).

dc_360_11



5.5.3.3.1. ábra Összefüggés a számított kreatinin clearance és a szérum AGE (felső panel), valamint a CML (alsó panel) között (korra korrigálva, n=88).

5.6. Albumin vizeletürítésének HPLC-vel történő mérése. A vizeletalbumin oxidatív és karbonil stressz általi módosítása, a mérés ismételhetősége

5.6.1. A vizeletalbumin oxidatív és karbonil stressz általi módosítása (VIII, LX)

5.6.1.1. Bevezetés

A tartósan fennálló 30 mg/nap fölötti albuminuria (kóros albuminuria) bizonyítottan a diabeteses nephropathia korai jelzője mind 1-es, mind 2-es típusú cukorbetegekben (235). Napjainkban egy új, a méretkizárásos kromatográfián alapuló HPLC-s módszer is rendelkezésünkre áll a mikroalbuminuria detektálására. Az új módszert alkalmazó vizsgálatok kimutatták, hogy az albuminuriát a hagyományos immunológiai módszerek – mint például az immunnephelometria (IN) – alábecsülik, mivel nem detektálják az albumin kis fokban denaturált, de nem fragmentált, ún. nem immunreaktív formáját (236-238). Mivel a vizsgálatokban a nem immunreaktív albuminforma

nagyobb arányban fordult elő a mikroalbuminuria alacsonyabb tartományában ezért feltételezték, hogy a plazma albumin egy részének valamiképp módosult frakciója a nem immunreaktív albumin (236).

Számos AGE termék – ahogyan az oxidációs termékek is – fluorofór és ezek 370 nm excitációs és 440 nm emissziós hullámhosszok között detektálhatók (239-242). Továbbá korábbi vizsgálatunkban kimutattuk, hogy ezeken a hullámhosszokon mért fluoreszcencia korrelál a nem fluoreszcens AGE-termék, az N-(carboxymethyl)lysin, kompetitív ELISA módszerrel mért szintjével.

Mivel az irodalomban nincs adat a HPLC-vel mért vizeletalbumin glikoxidációs szintjére vonatkozóan, célul tűztük ki a vizeletalbumin relatív fluoreszcenciájának mérését (mintegy a glikoxidáció indikátoraként) egy általunk kifejlesztett UV- és fluoreszcens detektoros HPLC segítségével. Ezen kívül összefüggést kerestünk az albumin-fluoreszcencia és a normo- és mikroalbuminuriás cukorbetegek klinikai paraméterei között. Valamint célunk volt in vitro kísérletekben fényt deríteni arra, hogy az albumin módosulása befolyásolja-e az immunreaktivitást.

5.6.1.2. Módszerek

5.6.1.2.1. Vizeletgyűjtés és vizeletalbumin-vizsgálat

Keresztmetszeti vizsgálatunkba 1-es és 2-es típusú, korábban immunnefelometriával (IN) normo-vagy mikroalbuminuriásnak talált betegeket vontunk be. A vizsgálat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottságának engedélyével készült. Az akut betegségben, lázban, hemodinamikai stresszben szenvedő, valamint a terhes és menstruáló nőket kizártuk. Reggeli első vizeletet gyűjtöttünk, a vizeletmintákat mérés előtt -80 °C-on legfeljebb két hétig tároltuk.

A vizeletmintákat mérés előtt szobahőmérsékletűre olvasztottuk, 30 másodpercig rázattuk majd lecentrifugáltuk (2500G, 10 perc). Továbbiakban a felülúszót vizsgáltuk. A vizeletalbumin illetve az in vitro készített különböző albuminformák koncentrációját IN-es módszerrel (IMMAGE Immunochemistry Systems, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA, szenzitivitás (méréshatár): 2 mg/l, méréstartomány: 2-8640 mg/l, intra- és inter-assay pontosság: 8% és 5%) és HPLC-s módszerrel (Shimadzu SPD 10AVvp, Shimadzu Corp., Japán) mértük. HPLC-vel történt méréseinkhez FDA által hitelesített AccuminTM kit-et használtunk (Accumin Diagnostics Inc., New York, NY, USA, λ =214 nm, szenzitivitás (méréshatár): 3 mg/l, méréstartomány: 3-2000 mg/l, inter-és intra-assay pontoság 5,8 % és 2,5%). Az AccuminTM kit méret kizárásos kromatográfián alapul, Zorbax Bio-Series GF 250 típusú oszlopot, Zorbax Diol típusú előoszlopot (mindkettőt az Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA-től rendeltük) és mobil fázisként sótartalmú foszfát puffert tartalmaz (pH=6,93). A vizsgálat során 25 µl mintát vizsgáltunk duplikátumban. A program egy 6 percig tartó 0,5 ml/perc áramlási sebességű majd egy 6,5-től 11,5 percig tartó 2 ml/perc áramlási sebességű szakaszból állt. Ezt követően visszatértünk a 0,5 ml/perc áramlási sebességre, majd a vízszintes alapvonal visszatértéig

mosás következett (általában a 22-dik percig). A vizeletalbumin retenciós ideje $\pm 2\%$ -kal belül volt a gyártó által biztosított albumin standardnak.

Az általunk alkalmazott HPLC-s vizsgálat során az UV detektorhoz párhuzamosan egy fluoreszcens detektort (Shimadzu RF 10AXL, Shimadzu Corp., Japan) kapcsoltunk, így lehetőségünk nyílt ugyanannak a mintának az egyidejű koncentráció és fluoreszcencia mérése is (5.6.1.2.1.1. ábra).



5.6.1.2.1.1. ábra A vizsgálatok során alkalmazott UV-fluoreszcens detektoros HPLC-rendszer.

A fluoreszcenciát 370 nm-es excitációs és 440 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk. A fluoreszcens detektor szenzitivitása és erősítése az első 6 percben a maximális értékre volt állítva, majd ezt követően a futtatás végéig közepes értékre állítottuk. Az fluoreszcens detektor által mért jel átlagosan 0,437 percet késett az UV detektorral kapott jelhez képest (ez annak az időnek felel meg, amely alatt az albumin az UV detektortól eljut a fluoreszcens detektorig).

Minden egyes vizelet kreatinin értékét a Jaffé-módszer szerint határoztuk meg és mind az INnel, mind a HPLC-vel mért albumin-koncentrációkkal albumin/kreatinin hányadost számoltunk. Minden más klinikai paramétert rutin labordiagnosztikai módszerekkel határoztunk meg.

5.6.1.2.2. Az albumin különböző formáinak in vitro vizsgálata

A humán szérumalbumint (HSA; A9511, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), a glikált humán szérumalbumint (GSA; A8301, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) és a methylglyoxallal módosított humán szérumalbumint (MGO-HSA) a párhuzamosan kapcsolt UV- és fluoreszcens detektoros HPLC-vel vizsgáltuk.

Az MGO-HSA előállítása Westwood és munkatársai módszerével történt (243). Röviden aszeptikus körülmények között 6,6 mg/ml HSA-t 1 mM methylglyoxallal (MO252, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) inkubáltunk 37°C-on 24 órán át 7,4-es pH-n. Az inkubáció után az MGO által módosult albumint 4°C-on 72 óra hosszat ammónium bikarbonát puffer ellenében dializáltuk (pH=7,9), ezzel eltávolítva a felesleges MGO-t. A HSA-ból és GSA-ból is készítettünk egy 6,6 mg/ml

koncentrációjú törzsoldatot. A HSA, GSA és MGO-HSA törzsoldatokat 50-szeresére hígítottuk, azután sorozat-hígításokkal a következő koncentrációkat állítottuk elő: 132, 66, 33, 16,5 és 8,25 mg/l.

5.6.1.2.3. A kromatogram elemzése

Az albumin standardok futtatása során az első csúcs az albumin dimer formája, mely nem számít az albumin-koncentráció számításakor. Második az albuminnak megfelelő csúcs. Az albumin után következő csúcs csak a fluoreszcens kromatogramokon figyelhető meg, mely artefakt (vak, csak foszfát puffert tartalmazó mintákkal megerősített), melyet az áramlási sebesség emelkedése okoz (lásd a HPLC-s program); ez a csúcs csak a fluoreszcens detektálás során tapasztalható, mivel sokkal érzékenyebb, mint az UV detektálás. A vizeletminták futtatása során az első az albumin csúcs (a dimer forma nem mindig volt jelen), melyet a vizelet többi összetevője követ, melyeket nem azonosítottunk. A csúcsok integrálása az alapvonalhoz történt (a kit gyártójának utasítása szerint) LCSolution szoftverrel (version 1.11 SP1, Shimadzu, Japan). A relatív fluoreszcenciát az albumin fluoreszcens detektálás során mért görbe alatti terület és az UV detektálás során mért görbe alatti terület hányadosaként számoltuk.

5.6.1.2.4. A HPLC-s albumin csúcs elemzése

Az AccuminTM kit-tel kapott albumin csúcs tisztaságának megítélésére nyolc random választott diabeteses beteg vizeletét vizsgáltuk meg. Ugyanabból a vizeletből egymást követő három futtatás albuminfrakciót gyűjtöttünk. A gyűjtött frakciót sótlanítottuk és kb. 150 µl-re bekoncentráltuk Ultracel YM-3 Centricon szűrő segítségével (Millipore, MA, USA) a gyártó utasítása szerint. Az így kapott mintát tovább szeparáltuk nem-porózus Kovasil MS C18 oszlopon (1,5 um, 33x4.6 mm-es részecske méret mellett, Zeochem AG, Uetikon, Schwitzerland). Grádiens elválasztást alkalmaztunk. Az "A"-oldat 0,1% trifluoro-ecetsav (TFA) és 5% acetonitril vizes oldata volt a "B" oldat 0,1 % TFA és 5% víz acetonitriles oldata volt. Az alkalmazott grádiens a következő volt: 0-20 perc között 0% "B" oldatról 60% "B"-oldatra, majd a következő percben 60%-ról 100%-ra. Az albumin csúcsot legyújtöttük és beszárítottuk. A rezidumot 3 µl desztillált vízben oldottuk fel, majd mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionizáció (MALDI) tömegspektrométerrel (Bruker Autoflex II MALDI- TOF/TOF, Bruker, Bréma, Mémetország) vizsgáltuk. A kontamináció számítását a nem albumin anyagok görbe alatti területé és az albumingörbe alatti területének hányadosaként számoltuk.

5.6.1.2.5. Statisztikai analízis

Statisztikai elemzéshez az SPSS program 13.0 verzióját (SPSS Inc., IE, USA) és a MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) programot használtuk. Az IN és a HPLC módszerek összehasonlításához Bland-Altman analízist használtunk. A normál eloszlású adatokat egyutas ANOVA analízissel és Pearson korrelációval hasonlítottuk össze. A nem normál eloszlású adatokat

Kruskall-Wallis teszttel, Mann-Whitney U-teszttel valamint Spearman rho-teszttel hasonlítottuk össze. A kategorikus változókat Chi-négyzet teszttel elemeztük. A normál eloszlást követő adatokat átlag±SEM, a nem normál eloszlású adatokat medián és interkvartilis tartományokkal jellemeztük. A p-értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak. Többváltozós lineáris regressziós analízist használtunk a vizeletalbumin fluoreszcencia független prediktorainak megállapítására.

5.6.1.3. Eredmények

5.6.1.3.1. Az UV - fluoreszcens HPLC rendszer jellemzői

Az UV- és fluoreszcens mérések intra-assay pontosságát öt különböző nap futtatott HSA, GSA és MGO-HSA minta (koncentrációk: 8,25, 16,5, 33, 66 és 132 mg/mmol) ötszöri mérésével ellenőriztük. A csúcsterületek intra-assay variációs koefficiensei a következők voltak: 1,5% (UV) és 8,0% (fluorescencia) a HSA, 1,6% és 5,7% a GSA és 4,2% és 6% az MGO-HSA esetében. Az UV és fluoreszcens mérések időbeni stabilitásának vizsgálatához és az inter-assay pontosság kiszámításához ugyanazon mintákat 12 hónap fagyasztás után felolvasztva öt alkalommal mértük le egy új kittel. A csúcsterületek inter-assay variációs koefficiensei az alábbiak voltak: 7,7% (UV) és 12,9% (fluoreszcencia) a HSA, 11,5% és 11,1% a GSA, míg 5,7% és 11,3% az MGO-HSA esetében.

A vizeletminták esetében is meghatároztuk az intra- és az inter-assay pontosságot. Az intraassay pontosság számításához 10 véletlenszerűen kiválasztott vizeletminta kétszeri, egy héten belül megismételt mérését végeztük. A betegek vizeletmintáinak UV és fluoreszcens csúcs területeinek intra-assay variációs koefficiensei 6,1% és 8,8% voltak. Az inter-assay pontosságot – egy új kittel – ugyanazon minták ismételt mérése alapján számoltuk 2 hét elteltével, mely alapján az UV- és a fluoreszcens mérések esetében ez az érték 8,6% és 11,5%-nak adódott. A vizeletmintákat 12 hónap múltán is újra mértük. Érdekes módon, míg az albumin UV csúcs alatti területében szignifikáns csökkenést (-25±23%, átlag±SD, p<0,05), addig a fluoreszcens csúcs alatti területében nem szignifikáns (11±46% átlag±SD, p=0,093) növekedést észleltünk.

5.6.1.3.2. A különböző albuminformák in vitro relatív fluoreszcenciája

A vizsgált koncentrációtartományon belüli különböző albuminformák UV- és a fluoreszcens jelének korrelációs analízise alapján kapott eredmények az alábbiak voltak: HSA, r=0,9998, GSA, r=0,9999, MGO-HSA, r=0,9997. A HSA relatív fluoreszcenciájának átlagát 100%-nak vettük. Az 5.6.1.3.2.1. ábráról leolvasható, hogy a HSA-éhoz viszonyítva mind a GSA, mind az MGO-HSA relatív fluoreszcenciája magasabb (mindkét esetben p<0,001).



5.6.1.3.2.1. ábra Összesített oszlopdiagramm a HPLC-görbék relative fluoreszcenciájáról. A human szérumalbumin (HSA), a glikált szérumalbumin (GSA) és a metilglioxállal módosított human szérumalbumin (MGO-HAS) relatív fluoreszcenciája (fluoreszcens regisztrátum görbe alatti terület/UV regisztrátum görbe alatti terület, mindegyik albumin-koncentrációja 33 mg/l volt, a HSA-t 100%-nak vettük). Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. p < 0,001 Kruskall–Wallis teszt; GSA vs. HSA: p < 0,001; MGO-HSA vs. GSA: p < 0,001 Mann–Whitney *U*-teszt.

5.6.1.3.3. Betegcsoportok

Keresztmetszeti vizsgálatunkban 79 diabeteses – ebből 59 IN-el normoalbuminuriás és 20 INel mikroalbuminuriás – beteget vontunk be. A mikroalbuminuria diagnózisához jelenleg használt albumin-kreatinin hányados (ACR) értékek (férfi: 2,5-25 mg/mmol, nő: 3,5-35 mg/mmol) alapján a következő betegcsoportokat képeztük: IN-el és HPLC-vel egyaránt normoalbuminuriás (NN, n=47), IN-el normo-, de HPLC-vel mikroalbuminuriás (NM, n=12), végül mindkét módszerrel mikroalbuminuriás (MM, n=20) betegek csoportja. A HPLC-s módszer esetében is a hagyományos ACR kritériumrendszert használtuk a mikroalbuminuria diagnózisához, mivel egyelőre nincs HPLC-s mérésekre adaptált változat.

A 5.6.1.3.3. táblázat a betegek klinikai paramétereit tünteti fel.

5.6.1.3.3. táblázat. A csoportok klinikai paraméterei

	NN	NM	MM		Р	
	(n=47)	(n=12)	(n=20)	NN vs. NM	NN vs. MM	NM vs. MM
Kor (évek)	52±2	60±4	59±2	NS	NS	NS
Nem (férfi/nő)	22/25	7/5	11/9	NS	NS	NS
Diabetes mellitus típusa (1-es típus/2-es típus)	13/34	2/10	5/15	NS	NS	NS
Dohányzók/nemdohányzók	5/42	1/11	5/15	NS	NS	NS
Angiotenzin-konvertáló-enzim-gátló (igen/nem) ^b	37/10	11/1	20/0	NS	< 0,05	NS
Angiotenzin-II-receptor-blokkolók (igen/nem) ^b	11/36	2/10	7/13	NS	NS	NS
ACR IN (mg/mmol) ^a	0,42 (0,21-0,77)	1,56 (0,89-2,16)	6,92 (5,06-10,48)	<0,001	<0,001	<0,001
ACR HPLC (mg/mmol) ^a	0,75 (0,36-1,26)	4,43 (3,05-7,35)	8,69 (6,75-13,84)	<0,001	<0,001	<0,001
Random plazmaglukóz (mmol/l)	8,72±0,51	10,12±1,60	7,57±0,70	NS	NS	NS
Fruktózamin (µmol/l)	317±11	333±30	303±16	NS	NS	NS
HbA _{1c} (%)	7,61±0,27	7,15±0,35	6,84±0,37	NS	NS	NS
Szisztolés vérnyomás (Hgmm) ^a	120 (110-130)	120 (112-130)	130 (120-150)	NS	NS	NS
Diasztolés vérnyomás (Hgmm) ^a	70 (70-80)	70 (61-70)	80 (60-80)	NS	NS	NS
BMI (kg/m ²)	30,51±0,98	32,60±3,57	32,68±1,13	NS	NS	NS
Összkoleszterin (mmol/l)	4,44±0,14	4,27±0,26	4,77±0,41	NS	NS	NS
Trigliceridek (mmol/l)	2,07±0,23	2,10±0,33	$2,50\pm0,40$	NS	NS	NS
LDL-koleszterin (mmol/l)	2,50±0,13	2,35±0,18	2,53±0,30	NS	NS	NS
HDL-koleszterin (mmol/l) ^a	1,18 (0,98-1,45)	1,10 (0,88-1,22)	1,07 (0,94-1,16)	NS	NS	NS
Hemoglobin (g/l)	132,0±2,4	134,8±4,4	131,3±4,7	NS	NS	NS
Hematokrit (%)	40,0±0,6	$40,5\pm1,1$	39,5±1,4	NS	NS	NS
Szérumkreatinin (µmol/l) ^a	78 (66-92)	96 (77-154)	101 (66-157)	<0,05	<0,05	NS
eGFR (Cockroft-Gault) (ml/min)	102±6	73±9	79,3±9	<0,05	<0,05	NS
Vizelet pH ^a	5,90 (5,30-6,20)	6,2 (5,00-6,50)	5,45 (5,00-5,90)	NS	NS	NS

^aA nem normális eloszlású adatok medián értékét adjuk meg (25-75 percentilis). Minden normális eloszlású adat átlag±SEM-ként szerepel. ^bFontos megjegyeznünk, hogy néhány beteg mind angiotenzin-konvertáló-enzim-gátlót, mind angiotenzin-II-receptor-blokkolót szedett és 5 beteg az NN-csoportban nem szedett semmilyen gyógyszert.

NN: mind immunnephelometriával, mind HPLC-vel normoalbuminuriás betegek, NM: immunonephelometriával normoalbuminuriás, de HPLC-vel microalbuminuriás betegek, MM: mindkét módszerrel microalbuminuriás betegek, ACR: albumin-kreatinin hányados, IN: immunnephelometria, HPLC: nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (high performance liquid chromatography), BMI: testtömegindex (body mass index), eGFR: becsült (estimated) glomerulus filtrációs ráta

Az NM és MM csoportokban a szérumkreatinin értékek szignifikánsan magasabbak, míg az eGFR értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az NN csoporthoz viszonyítva, de az NM és MM csoportok között ezekben a paraméterekben nem mutatkozott szignifikáns különbség. Az MM csoportban több páciens szedett angiotenzin-konvertáló-enzim-gátlót, mint az NM csoportban. Ezen kívül egyéb különbség nem volt a betegcsoportok között.

5.6.1.3.4. Az IN-el és a HPLC-vel mért albumin-koncentrációk összehasonlítása

In vitro vizsgálatunkban az IN-nel és méret-kizárásos HPLC-vel kapott három mérés átlagát kiszámoltuk minden albumin-koncentrációra és az in vitro preparált albumin minden formájára. Ezen átlagoknak számoltuk ki az IN/HPLC hányadosát, majd az értékeket egyutas ANOVA analízissel hasonlítottuk össze. Az in vitro kísérletben nem mutatkozott különbség az IN-el és a HPLC-vel mért különböző albuminformák koncentrációinak átlaga között (HSA:19±18%, GSA: 12±16% és MGO-HSA:24±27, p=0,399, ANOVA-teszt).

Az 5.6.1.3.4.1. ábrán – humán vizsgálatunkban – a két mérési módszer (IN és HPLC) Bland-Altman analízisének eredményét tüntettük fel. Mivel az adatok nem követték a normál eloszlást, mindkét módszer ACR értékeit logaritmikusan transzformáltuk az ábrázolás előtt. Az ábráról leolvasható, hogy az IN-hez viszonyítva a HPLC a mérések túlnyomó többségében magasabb vizeletalbumin-koncentrációkat mér és az eltérés nagysága a vizeletalbumin-koncentrációval fordított arányban áll.



5.6.1.3.4.1. ábra Az albumin-kreatinin hányadosok HPLC-vel és immunnefelometriával (IN) meghatározott értékeinek Bland–Altman plot diagrammja.

5.6.1.3.5. A diabeteses betegek vizeletalbumin relatív fluoreszcenciája

Az MM csoport vizeletalbumin relatív fluoreszcenciája magasabbnak adódott mind az NN, mind az NM csoportokhoz képest (p<0,001 és p=0,007), de az NN és NM csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget (p=0,201) (5.6.1.3.5.1. ábra).



5.6.1.3.5.1. ábra Összesített oszlopdiagramm a HPLC-görbék relative fluoreszcenciájáról. NN= mindkét módszerrel (HPLC-vel és immunnefelometriával) normo-, NM= immunnefelometriával normo- és HPLC-vel mikro-, MM= mindkét módszerrel mikroalbuminuriásak. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. p < 0,001 Kruskall–Wallis teszt; NN vs. NM, p = 0,852; MM vs. NN, p < 0,001; MM vs. NM, p = 0,001 Mann–Whitney *U*-teszt.

A vizeletalbumin relatív fluoreszcenciája pozitívan korrelált a szérumkreatinin-szinttel (r=0,295, p=0,009) és negatívan az eGFR értékekkel (r=-0,255, p=0,026), de nem korrelált a glikémiás paraméterekkel (plazma glükóz: p=0,766, fruktózamin: p=0,979, HbA_{1c}: p=0,442). Többváltozós lineáris regressziós vizsgálatunk alapján a szérumkreatinin és az eGFR bizonyult a vizeletalbumin relatív fluoreszcencia független prediktorának (B=0,001; β =0,397; p=0,014 és B=-0,08; β =-0,337; p=0,039). Az első modell elemei az életkor, plazma glükóz, fruktózamin, HbA_{1c}, szisztolés és diasztolés vérnyomás, triglicerid, LDL és HDL koleszterin, hemoglobin és szérumkreatinin voltak, míg a második modell elemei az előbb felsoroltakat, annyi különbséggel, hogy a szérumkreatinin helyett az ln eGFR elemet tartalmazta.

Ezen kívül a vizeletalbumin relatív fluoreszcenciája korrelált (r=-0,292, p=0,025) a nem immunreaktív albumin-koncentrációjával (melyet a HPLC-vel és az IN-el mért albumin-koncentrációk különbségéből számítottunk).

5.6.1.3.6. A HPLC albumin monomer csúcs tisztasága

A nem albumin csúcs görbe alatti területe a teljes csúcs görbe alatti területhez való viszonya alapján a nem albumin anyagok a méretkizárásos HPLC mérés albumin csúcsában 12,7±5,2% (átlag±SD) arányban voltak jelen.

5.6.2. Albumin vizeletürítésének HPLC-vel történő mérése. A tiol-csoportok szerepe. (**IX, LIX**) 5.6.2.1. Bevezetés

Míg egyre több közlemény jelenik meg a HPLC-s albuminuriás mérésekről, a mérési módszer jellemzéséről annál kevesebb. Az irodalomból ismert, hogy a csak HPLC-vel mérhető nem immunreaktív albumin redukáló környezetben könnyen fragmentálódik kisebb molekulasúlyú darabokra (236). Mivel ebben szerepe lehet az antioxidáns szulfhidril csoportoknak, vizsgálni kívántuk ezek szerepét. A vizeletben mérhető albumin mennyiségének időbeli változását feltételezhetően a vizelet pH-ja is befolyásolja, bár erről kevés adat áll rendelkezésünkre (244). Ehhez 2,5 évvel korábban HPLC-vel mért, majd -80°C-on tárolt vizeletminták albumin-koncentrációját határoztuk meg újra. A vizsgálat során a HPLC-vel mérhető dimer és monomer albuminforma változását is vizsgálni kívántuk. Ezen kívül a vizeletalbumin-csökkenés feltételezett pH-függését és a tárolt, illetve friss vizeletek redukáló kapacitását hasonlítottuk össze a vizelet összes szabad szulfhidril csoport (TFSG) mérésével.

5.6.2.2. Módszerek

5.6.2.2.1. Betegcsoportok

A 2005 májusában a pécsi II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum diabetológia szakrendelésén megjelent, IN módszerrel normo- és mikroalbuminuriás, 2-es típusú cukorbeteget vontuk be egy keresztmetszeti vizsgálatba. Ahhoz, hogy friss vizelet összes szabad szulfhidril csoportjainak koncentrációját is meg tudjuk határozni 2008-ban újabb IN módszerrel normo- és microalbuminuriás 2-es típusú diabeteses beteget vontunk be a vizsgálatba. A két különböző időpontban vizsgált betegcsoport klinikai paraméterei nem különböztek egymástól (lásd 5.6.2.2.1.1. táblázat).

5.6.2.2.1.1. táblázat A két vizsgált betegcsoport klinikai jellemzői

	Tárolt vizelet	Friss vizelet	
	csoport	csoport	p érték
	(n=16)	(n=16)	1
Kor (évek)	63±14	57±13	0,234
Nem (férfi/nő)	15/1	14/2	0,544
RAAS medikáció (igen/nem)	13/3	9/7	0,127
Random plazma glükóz (mmol/l)	7,0±2,1	7,9±2,7	0,270
Fruktózamin (µmol/l)	288±91	298±54	0,746
HbA1c (%)	7,4±1,9	8,2±1,6	0,294
Systolés vérnyomás (Hgmm)	127±18	128±13	0,818
Diastolés vérnyomás (Hgmm)	72±13	79±8	0,082
BMI (kg/m ²)	30±6	32±4	0,319
Összkoleszterin (mmol/l)	4,48±1,17	4,75±1,26	0,552
Triglicerid (mmol/l)	2,08±1,23	2,63±2,52	0,442
LDL (mmol/l)	2,61±1,11	2,55±0,90	0,899
HDL (mmol/l)	1,17±0,32	1,29±0,34	0,325
Vér karbamid nitrogén (mmol/l)	9,64±6,06	8,55±6,18	0,619
Szérumkreatinin (μmol/l)	114±64	115±88	0,958
Számított glomerulus filtrációs ráta (Cockroft- Gault) (ml/min)	68±30	83±33	0,185
Vizelet pH	5,9±0,8	5,7±0,7	0,473

A folytonos változók átlag±SD formában vannak jelölve. RAAS= renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer. BMI=body mass index (testtömegindex).

A vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága jóváhagyta. A vizsgálatból minden olyan beteget kizártunk, akinek akut, zajló betegsége volt, lázas volt vagy jelentős hemodinamikai stressznek volt kitéve a vizsgálatot megelőző 1 hétben, továbbá kizártuk a malignus betegségben szenvedő betegeket és a menstruáló és terhes nőket.

5.6.2.2.2. Laboratóriumi módszerek

A betegektől minden esetben reggeli első vizeletmintát kértünk és 2005-ben minden betegtől 3 Eppendorf vizeletet tettünk félre -80°C-ra. A vizeletek albumin-koncentrációját 10 perces 2500 g-s centrifugálást követően az FDA által jóváhagyott HPLC-s AccuminTM kittel határoztuk meg (Accumin Diagnostics Inc., New York, NY, USA) A vizeletek pH-ját mikroprocesszoros pH-mérő készülékkel mértük meg (HI 9024 pH-meter, Geo Scientific Ltd., Canada). A betegek egyéb laboratóriumi paramétereit a rutin labordiagnosztika segítségével határoztuk meg.

Vizsgálatunk során külön vizsgáltuk az albumin dimer és monomer formáját (a méréshez szintén az AccuminTM Kit-et használtunk, a gyártó útmutatatásának megfelelően, miszerint a közvetlenül az albumin (a vizsgált és mért monomer forma) előtt eluálódó csúcs a dimer-albumin). A dimer és a monomer albumin csúcs alatti területének hányadosát (DMR) is kiszámoltunk. A dimer forma elúciós

idejének meglétét és pontosságát a csúcs visszanyerési módszerrel állapítottuk meg, külső humán albumin standard minták hozzáadásával. A standard mindkét albuminformát tartalmazta.

Két és fél éves -80 C-on történt tárolás után minden betegtől kettő Eppendorf, a vizsgálat előtt korábban fel nem olvasztott, vizeletet vettünk elő. Megmértük a vizeletalbumin-koncentrációt HPLCmódszerrel, továbbá mind a dimer, mind a monomer albumin-forma csúcs alatti területét meghatároztuk és a DMR-t ismételten kiszámoltuk.

A tárolt és frissen gyűjtött vizeletminták TFSG szintjét szintén megmértük. A vizeletminták előkészítése a HPLC-s vizeletalbumin-koncentráció mérések során alkalmazott eljárással megegyeztek. Ezt követően, 0,98 ml vizeletmintához 10 µl, 100 µM végkoncentrációjú, feleslegben hozzáadott Ellmanreagenst (5, 5'-dithio-bis-t (2-nitrobenzoe) sav, DTNB, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Németország) mértünk be egy 3 ml-es quartz küvettában. A maximum abszorbanciát DTNB-mentes vizelet ellenében 412 nm-en mértük Hitachi U-2001 típusú spektrofotométer segítségével (Tokyo, Japan) 3600 másodperces megfigyelés során. Amint a platót elérte a folyamat (lejátszódott a reakció), 10 µl, 10 µM végkoncentrációjú frissen készített redukált glutathiont (GSH, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Németország) adtunk a mintákhoz, és ismét lemértük az így kapott maximális abszorbanciát. Ezekből az adatokból a vizelet TFSG szintjét µM GSH ekvivalens egységekre a következőképpen számoltuk: GSH hozzáadásával mért maximum abszorbancia –DTNB feleslegben való hozzáadásával mért maximum abszorbancia; majd a DTNB hozzáadásával mért maximum abszorbanciát osztottuk az előbb számolt különbséggel és ezt szoroztuk 10-zel. Mind a frissen gyűjtött, mind a tárolt vizeletmintákat szobahőmérsékleten mértük. A TFSG szint mérését a friss illetve a felolvasztott minták esetében a mintavétel illetve a felolvasztást követő l órán belül elvégeztük.

5.6.2.2.3. Statisztikai analízis

Statisztikai számításainkat az SPSS program 13.0-ás verzióját használtuk (SPSS Inc., IE, USA). A tárolt minták változásainak elemzésére Wilcoxon-tesztet, a DMR változásainak elemzésére, pedig párosított t-próbát használtunk. Független mintás t-próbát alkalmaztunk a friss és tárolt vizeletminták közötti különbségek vizsgálatára és a két vizsgálati populáció klinikai paramétereinek összehasonlítására. A korrelációs analízist Pearson-korrelációval végeztük el. Chi-négyzet tesztet alkalmaztunk a kvalitatív változók összehasonlítására. Az adatokat átlag±SD formában adjuk meg. A p-értékét <0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak.

5.6.2.3. Eredmények

A HPLC-vel mérhető albuminuria 2,5 év -80°C-os tárolás után 24±9%-kal (átlag±SD) csökkent (vizeletalbumin-koncentráció: 2005: 88±259 mg/l, 2008: 55±187 mg/l, p=0,002). Ha a betegeket a vizeletalbumin koncentrációjának a csökkenése (nagyobb és kisebb %-os csökkenés, mint a futtatások közbeni pontosság) és a vizelet pH szerint (a minták átlagos pH-ja alatt és felett) kategorizáltuk, szignifikáns összefüggést kaptunk az átlag alatti vizelet pH és a nagyobb %-ú vizeletalbumin koncentrációjának a csökkenése között (p=0,030).

A vizelet dimer és a monomer albumin csúcs alatti területének hányadosában, a DMR-ben szignifikáns növekedést észleltünk (5.6.2.3.1. ábra, A panel, p<0,001). A két formát külön vizsgálva azonban azt találtuk, hogy csak a monomer albumin-forma csúcs alatti területei (azaz az albumin-koncentrációja) változtak szignifikánsan (5.6.2.3.1. ábra, B panel, p<0,001), míg a dimer albumin-forma csúcs alatti területei nem mutattak szignifikáns változást (5.6.2.3.1. ábra, C panel, p=0,275).



dc_360_11



5.6.2.3.1. ábra Az "A" panel a vizeletalbumin dimer/monomer hányadosának növekedését (p<0,001) mutatja 2,5 éves tárolás után. A "B" panel a vizeletalbumin monomer formájának csúcs alatti területeinek változását (p<0,001), míg a "C" panel a dimer formájának nem szignifikáns (p=0,275) változását mutatja 2,5 éves tárolás után. Mivel a csúcs alatti területek adatai mind a dimer, mind a monomer forma esetében nem normál eloszlást mutattak, ezek az adatok boxplot segítségével ábrázoltuk. A vastag, középső vonal a

mediánt; a téglalapok végei a 25 és 75-ös percentilist és a boxplotok végei a minimumot és a maximumot jelöli.

Exponenciális összefüggést találtunk a vizelet pH és a friss vizeletek TFSG-je között (5.6.2.3.2. ábra A panel, a lineáris korreláció értékei: r=-0,795, p<0,001). Ez az összefüggés már nem volt kimutatható a 2,5 évig tárolt vizeletminták vizsgálata során (5.6.2.3.2. ábra B panel, a lineáris korreláció értékei r=-0,216; p=0,261). Az átlagos TFSG szint szignifikánsan alacsonyabb volt a tárolt vizeletmintákban a frissekhez képest (tárolt vizeletek: $6,6\pm7,7$ és friss vizeletek: $22,7\pm14,3$ µM GSH ekvivalens, p<0,001). Továbbá szignifikáns összefüggést találtunk a DMR növekedés és a pH között (5.6.2.3.2. ábra C panel) (r=-0,382, p=0,041).



dc_360_11



5.6.2.3.2. ábra. Az "A" panel a friss vizeletek pH-ja és az összes szabad szulfhidril csoportja (μM redukált glutation (GSH) ekvivalens egységben) közötti összefüggést mutatja (r=-0,795; p<0,001, lineáris korreláció értékei). A "B" panel e korreláció eltűnését mutatja 2,5 éves, -80°C-os tárolás

után (r=-0,216; p=0,261, lineáris korreláció értékei). Megjegyezzük, hogy, pH 7,1-nél és 5,6-nál 2-2 minta esetében nagyon hasonló eredményeket kaptunk (2,86, 2,89 és 0,41, 0,46). A "C" panel a vizelet pH és a HPLC-vel mért vizeletalbumin dimer/monomer hányadosának (DMR) 2,5 éves változása közötti összefüggést ábrázolja (r=-0,382, p=0,041).

5.7. Glomeruláris típusú haematuria modellezése karbonil- és oxidatív stresszel

5.7.1. Glomeruláris típusú haematuria modellezése (X)

5.7.1.1. Bevezetés

A haematuria a legkülönbözőbb urogenitális betegségek tünete lehet, a fejlődési rendellenességektől a gyulladásokon keresztül a daganatos megbetegedésekig. A haematuria okának, lokalizációjának megtalálása gyakori és nehéz differenciáldiagnosztikai kérdés. Glomerulonephritisekben (GN) és nagyon sok glomeruláris eredetű vesebetegségben glomeruláris típusú, glomeruláris eredetű vérzésre (GV) jellegzetes dizmorf vörösvértestek kerülnek a vizeletbe (245). Ezek a GV-k centrifugált, festetlen vizeletüledék készítményekben is felismerhető jellegzetes membránlefűződéseket, "bleb-képződést" mutatnak. A glomeruláris haematuriában észlelt GV kialakulásának mechanizmusa nem teljesen ismert (246,247).

A glomerulonephritisek összefüggnek a "megnövekedett" oxidatív stresszel (248). Az oxidatív stressz, nevezetesen a megnövekedett szabad gyökök mennyisége reaktív dikarbonil gyökök képződéséhez vezet. Jelentős dikarbonil molekula a metilglioxál (MGO), ami egy alpha-oxo-aldehid, vagy alphadikarbonil molekula, mely keletkezhet a glukóz fém-katalizálta autooxidációjából, más szénhidrátokból, Schiff bázisokból és "Amadori termékekből" (249,250), vagy foszfát intermedierek (glicerinaldeh<u>i</u>d-3foszfát, dihidroxiaceton-foszfát) nem-enzimatikus fragmentációja révén a glikolízis-út során (251). Az MGO és egyéb dikarbonilok akkumulációja karbonil-stresszt okoz. A dikarbonilok reagálnak a fehérjékkel, és így karbonil-stressz termékek képződnek. A karbonil-stressz termékek lerakódása figyelhető meg pl. IgA NP-ben (252).

Ebben a tanulmányunkban azt a hipotézist vizsgáltuk, hogy metilglioxál hatására kialakulnak-e glomeruláris típusú vörösvértest alakok?

5.7.1.2. Módszerek

5.7.1.2.1. Vörösvértest morfológiai vizsgálataink

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta. Írásos beleegyezést követően egészséges önkéntesektől vért vettünk heparint tartalmazó csövekbe. A plazma és a buffy coat eltávolítására a mintákat 2400g-vel centrifugáltuk 5 percig. A vörösvértest (vvt) -üledéket

háromszor mostuk 7,4-es pH-jú, 5 mM glukóz tartalmú fiziológiás sóoldatban. A mosott vvt-ket 7,4-es pH-jú, 5 mM glukóz tartalmú Ringer-oldatban reszuszpendáltuk. A mosott vvt-szuszpenzió hematokritját sejtszámláló segítségével 0,1%-ra állítottuk. A vvt-szuszpenziót szobahőmérsékleten 1 mM MGO-val inkubáltuk 10, 20 és 30 percig, illetve a 30 perces inkubációt elvégeztük 0,25 mM és 0,5 mM MGO koncentrációkkal is. Újabb mosást követően a vvt-ket 0,2 μm pórusméretű baktériumszűrőn átszűrt vizeletben inkubáltuk 60 percig. Az inkubáláshoz olyan vizeletet használtunk, melynek fajsúlya 1011 körüli volt, mivel a laboratóriumi jegyzőkönyv alapján a glomeruláris vvt-ket tartalmazó vizelet minták fajsúlya átlagosan 1011 volt (1001-1025 közötti tartományban). Az ép vvt-ket tartalmazó vizelet minták fajsúlya 1010 volt (szintén 1001-1025 közötti tartományban). Ezek alapján a vizelet fajsúlyának nincs szerepe a glomeruláris vvt-k kialakulásában.

5.7.1.2.2. Fénymikroszkópos vizsgálat

Centrifugálást (2400g, 5 perc) követően a vvt üledéket tárgylemezre cseppentettük, fedőlemezzel fedtük, majd a friss, fixálatlan mintákat süllyesztett kondenzorú fénymikroszkóppal, 400x-os nagyítással vizsgáltuk. A 7 független sorozatból minden esetben 10 látóteret rögzítettünk számítógéphez kapcsolt digitális kamerával. A glomeruláris típusú vvt-alakok arányát százalékban adtuk meg.

5.7.1.2.3. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A fent leírt módon kezelt vvt-k fixálásához 1%-os glutáraldehid oldatot használtunk, 0,1 molos foszfátban (pH 7,4). Félórás fixálás után 3 percig 13000-es fordulaton centrifugáltuk, majd a mintát fedőlemezre cseppentettük. Az aranyozáshoz ION SPUTTER JFC-1100 (Jeol Limited, Tokyo, Japan) műszert használtunk. Az aranyozás technikai adatai: 1 kV 3mA 15'. A vizsgálatokat JEOL JSM 6300 pásztázó elektronmikroszkóppal végeztük, és a felvételeket FORTEPAN 100 ASA 6x9 cm. fekete-fehér filmre készítettük.

5.7.1.2.4. Statisztikai módszer

A fénymikroszkópos eredményeket átlag ± SEM formájában ábrázoltuk, a statisztikai értékeléshez Kruskal-Wallis tesztet és a Mann-Whitney U tesztet használtunk.

5.7.1.3. Eredmények

Metilglioxál hatására glomeruláris típusú vörösvértestek jöttek létre. A GV-ben észleltekkel megegyező, jellegzetes vörösvértest morfológiai elváltozásokat találtunk. A vörösvértestek felszínén egy, vagy több, gömbölyded membránkiboltosulás, "bleb" alakult ki, részben kifejezett lefűződésekkel

(5.7.1.3.1. ábra). A pásztázó EM vizsgálataink ezeket az észleléseinket megerősítik (5.7.1.3.2. ábra). Ezek a vvt-formációk egyértelműen eltértek az egyéb módon kialakuló, így például az ozmotikus alapon létrejövő degeneratív vörösvértestek alakváltozásaitól (5.7.1.3.3. ábra)



5.7.1.3.1. ábra. In vitro metilglioxál indukálta glomeruláris vérzés (GV) kialakulása. Egy veseköves beteg ép vvt-ket tartalmazó vizeletüledéke (**A**) és egy IgA nefropathiában szenvedő beteg glomeruláris típusú vvt-ket tartalmazó vizeletüledéke (**B**) látható. Kezeletlen, normális vvt-k (**C**, **E**, **G**) és az MGO hatására in vitro képződött vvt-GV alakok (nyíl és nyílhegy) (**D**, **F**, **H**). n= 400x.

dc_360_11



5.7.1.3.2. ábra A kezeletlen (A) és az MGO-val kezelt (B, C, D, E, F), vvt-k pásztázóelektronmikroszkópos képe. Jól láthatók az MGO hatására kialakult jellegzetes membránkiboltosulások, lefűződések (nyilak). Bar =10 mikrométer



5.7.1.3.3. ábra Ozmotikus alapon létrejövő degeneratív vörösvértest-alakváltozások. Jellegzetes buzogány alakú, tüskés felszínű vvt-k. n= 400x

A glomeruláris típusú vvt-k aránya a 30 percig MGO-val kezelt vvt-szuszpenzióban az MGO koncentrációjának növelésével fokozatosan emelkedett. A kontrollban 5,4 \pm 3,9% volt, majd 0,25 mM MGO hatására 21,9 \pm 8,6%-ra, 0,5 mM MGO hatására 29,3 \pm 5,8%-ra (p < 0,01 vs. kontroll) és 1 mM MGO hatására 48,9 \pm 4,8%-ra emelkedett a károsodott vvt-k aránya (p < 0,01 vs. kontroll, 5.7.1.3.4. ábra).

dc_360_191



5.7.1.3.4. ábra A glomeruláris típusú vvt-k aránya a 30 percig MGO-val kezelt vvt-szuszpenzióban az MGO koncentrációjának növelésével fokozatosan emelkedett.

Az 5.7.1.3.5. ábrán látható, hogy az 1 mM MGO hatása már 10 perc inkubációs idő mellett kifejlődött (glomeruláris vvt-k aránya: $38,1 \pm 4,1\%$, p < 0,01 vs. kontroll), és a 20 perces inkubáció hatása (glomeruláris vvt-k aránya: $49,6 \pm 4,4\%$, p < 0,01 vs. kontroll) már megegyezett a 30 perces inkubációéval.

dc 360 100



5.7.1.3.5. ábra A glomeruláris típusú vvt-k képződése MGO hatására az inkubációs idő függvényében.

5.7. Glomeruláris típusú haematuria modellezése karbonil- és oxidatív stresszel5.7.2. A metilglioxál oxidatív stresszt vált ki vörösvértestben (XI)

5.7.2.1. Bevezetés

A MG L-argininnel történő reakciójában imidazolon és/vagy argpirimidin képződik (253-255). Egy elektron spin rezonanciát (ESR) használó tanulmány már leírta néhány jellegzetességét az L-alanine-MG reakciónak (256), de keveset tudunk az L-arginin-MG interakciójáról, vagy az MG sejthatásairól. Az L-arginin különleges jelentőségét az adja, hogy ez az aminosav a vazodilatátor NO képződésének prekurzora is egyben.

Még kevesebbet tudunk az esetleges vas-MG-aminosav interakciókról. Rendelkezünk ugyan adatokkal arról, hogy a nem enzimatikus glikációt az átmeneti fémek befolyásolhatják (257-259), de az MG-aminosav interakcióra gyakorolt vashatást még nem vizsgálták. A szabad gyökök túltermelésével járó állapotok (pl. gyulladásos vesebetegségek) esetén fokozott vasmobilizációval kell számolnunk, mert a hidroxil szabad gyök vasat mobilizál az intracelluláris ferritinből (260). Ez a nem hem-vas redoxreakciókban könnyen részt vehet, melynek során szuperoxid szabad gyök termelődhet. A nem hem-

vas túlnyomórészt ferro formában van jelen a sejtben, melynek koncentrációját 0,1-1,0 μM-ra becsülik human eritroleukemia K562 sejt esetében (261). A sejtekben egyszerre zajlik a vas mobilizáció és szekvesztráció, valamint az oxidáció és redukció, mely folyamatok eredője egy bizonyos steady state állapothoz vezet.

A szabad L-arginin intracelluláris koncentrációját a szubmillimoláris-millimoláris tartományba helyezik (262). Kémiailag módosított L-arginin akkumulációja esetén fennáll annak lehetősége, hogy olyan termék is képződhet, amely a nitrogén-monoxid szintáz enzim kompetitív antagonistájaként is működik (263), ezért ennek az aminosavnak a módosítása különlegesen érdekes lehet.

Ennek a vizsgálatsorozatnak az volt a célkitűzése, hogy tanulmányozza az MG L-argininnel és vörösvértesttel kialakított szabadgyökös reakcióit és azok hatását az intracelluláris kálciumanyagcserére a vas ferro és ferri formájának jelenlétében.

5.7.2.2. Módszerek

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta. Vizsgálatainkhoz írásos beleegyezést követően egészséges önkéntesektől Vakutainer® rendszerben vettünk vért heparint tartalmazó csövekbe. A plazma és a buffy coat eltávolítására a mintákat 2400 g-vel centrifugáltuk 5 percig. A vvt-üledéket háromszor mostuk 7,4-es pH-jú, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO4, 0,5 mM Na2HPO4, 10 mM hidroxietil-piperazin etánszulfonsav (HEPES) és 5 mM glukóz tartalmú pufferben. A mosott vvt-eket 7,4-es pH-jú, 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgSO4, 0,1 mM CaCl2, 60 mM HEPES és 5 mM glükóztartalmú pufferben reszuszpendáltuk. A vvt-szuszpenzió hematokritját sejtszámláló segítségével 0,1%-ra állítottuk be. A vvt-eket dichlorofluoresceinnel (5 µM, 20 perc) és fura-2-pentakisacetoximetilészterrel (Fura-2-AM, 1 µM, 30 perc) inkubáltuk. A dichlorofluorescein fluoreszcenciáját, melyet az intracelluláris szabad gyökök váltanak ki, 504 nm excitációs és 526 nm emissziós hullámhosszon mértük. A szabad, ionizált kalcium intracelluláris koncentrációját Fura-2-AM segítségével, a Grynkiewicz és munkatársai (264) által leírtak szerint határoztuk meg. A méréseket Hitachi F-4500 fluoreszcens spektrofotométerrel (Hitachi, Tokyo, Japán), végeztük 37 °C-on. A vvt ülepedésének megelőzésére folyamatos, alacsony sebességű keverést alkalmaztunk. A fluoriméter vezérléséhez a Multi-Wavelength Time Scan System (Hitachi, Tokyo, Japán) programot használtuk. A vvt-szuszpenzió dichlorofluoreszcein és Fura-2-AM eredetű fluoreszcenciáját 10 percig rögzítettük. A mérés első percének végén ferrovasat (pozitív kontroll) vagy MGO-t injektáltunk a küvettába. Az antioxidánsokat a mérés elején adtuk a vvt-szuszpenzióhoz. Az antioxidánsok végkoncentrációja a következő volt: szuperoxiddizmutáz (SOD): 200 nemzetközi egység (NE)/ml; kataláz: 2000 NE/ml; trolox (E-vitamin-analóg, lipid-peroxidáció-gátló): 0,1 mM; dezferrioxamin (mely a

ferrovasat ferri vassá oxidálja, és a ferri vas megkötésével meggátolja a vas redox ciklusát): 1 mM; redukált glutation (GSH): 5 mM. Az antioxidánsok nem interferáltak a fluoreszcens metodikával, kivéve a katalázt, ezért ennek hatását a Fura-2-AM esetében nem tudtuk mérni. A 100 µM ferro vas és/vagy 1 mM MG által kiváltott hatást 100%-nak vettük.

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

Spektrofotometriás módszert dolgoztunk ki az MG által kiváltott ferrivasredukció mérésére. A ferro vasat a ferrozin, színreakció képződése közepette, komplexálja, amely komplexnek abszorpciós maximum 561 nm-nél található. A 100 µM ferri vasat és 1 mM ferrozint tartalmazó oldatba 1 mM MG-t adva indítottuk a színreakció, amit 60 percen keresztül mértünk. A ferri vas redukcióját dezferrioxamin meziláttal gátoltuk, amely a ferri vasat komplexálja. A spektrofotometriás mérést pH 7,5-nél végeztük, MG-t nem tartalmazó oldattal szemben.

Az MG és az L-arginin szabadgyökös reakcióinak direkt követésére alkalmas ESR vizsgálatokat is végeztünk (Bruker ESP 300E), melynek során a foszfát pufferben oldott L-arginin és MG végkoncentrációja 0,5 M volt. Az ESR méréseket 8,5-ös pH-nál végeztük, mert 7,5-nél gyengébb jelet kaptunk. Az ESR beállítása a következő volt: microwave power: 20 mW, modulation amplitude: 0,2 G, scan width: 100 G. A szabad gyök koncentrációját az ESR jel kettős integrációja alapján számítottuk ki. Kalibrációra 10 μM-os maleinimidet használtunk. A ferri és a ferro vasból is 0,62-10 mM végkoncentrációt használtunk, amit a mérés előtt adtunk az L-arginin+MG-t tartalmazó oldathoz. Annak vizsgálatára, hogy a vas melyik redoxállapotú formájának van hatása az L-arginin-MG reakciójára 10mM-os dezferoxamint (ferri vas kelátort) vagy 40 mM-os ferrozint (ferro vas komplexálót) használtunk.

Az ESR-vizsgálatok alapján felmerült annak lehetősége, hogy az L-arginin-MG-reakciónak különböző lehet a kinetikája, vagy más termék keletkezik ferri és ferro vas esetében. Ezt ellenőrizendő Hitachi 2001 UV/látható kétsugaras spektrofotométerrel vizsgáltuk az L-arginin-MG reakciója következtében, a látható spektrumban kialakuló barnulási színreakciót. Az L-arginin+MG+vas spektrumát, L-arginin+MG-vel szemben, minden percben megvizsgáltuk. Mindkét vas végkoncentrációja 10 mM volt. Az időfüggő görbét L-argininnal szemben vettük föl.

5.7.2.3. Eredmények

5.7.2.3.1. A metilglioxál, a ferro vashoz – mint pozitív kontrollhoz – hasonlóan, szabadgyök-termelést okoz vörösvértestekben

A szabadgyök-termelődésre utal a diklorofluoreszcein fluoreszcencia-növekedése. Az 5.7.2.3.1.1. ábra A panelje a ferro vas, a B panelje az MG hatására megnövekvő szabadgyök-koncentrációt mutatja. A

Fura-2-AM 340 nm / 380 nm hányadosaként az intracelluláris calcium koncentrációját tükrözi. Látható, hogy a ferro vas (C panel) és az MG (D panel) hatására is megemelkedett az intracelluláris kálcium koncentrációja.



5.7.2.3.1.1. ábra Az intracelluláris oxidatív stressz mérésére szolgáló dichlorofluorescein és az intracelluláris kalcium koncentráció meghatározásához használt Fura-2-AM fluoreszcenciájának eredeti regisztrátumai. Az intracelluláris oxidatív stressz fokozódását okozta a ferro vas (A) és a metilglioxál (B), valamint intracelluláris kalciumkoncentráció-növekedés jött létre a ferro vas (C) és a metilglioxál hatására (D).

A ferro vas, mint pozitív kontroll, koncentrációfüggő módon növelte a szabadgyök-termelődést és a kálciumkoncentrációt (5.7.2.3.1.2. ábra felső és alsó panel).

dc_360_101



5.7.2.3.1.2. ábra A ferro vas oxidatív stresszt (felső panel) és intracelluláris calcium-akkumulációt (alsó panel) okozott vvt-kben. A 100 μ M ferro vas hatását vettük 100%-nak (átlag ± SD, n=6).

Az MG szintén koncentrációfüggően növelte a szabadgyök-termelést és az intracelluláris kálcium koncentrációját (5.7.2.3.1.3. ábra felső és alsó panel).

dc_360_101



5.7.2.3.1.3. ábra A metilglioxál oxidatív stresszt (felső panel) és intracelluláris kálciumakkumulációt (alsó panel) okoz vörösvértestekben. A 100 μ M ferro vas által kiváltott hatást vettük 100%-nak (átlag ± SD, n=6).

A ferro vas és az MG koinkubációja vvt-kkel nem okozott nagyobb oxidatív stresszt, mint a ferro vas önmagában (5.7.2.3.1.4. ábra), viszont a koinkubáció szignifikánsan kisebb calcium-akkumulációt hozott létre, mint az MG önmagában.

dc_360_10



5.7.2.3.1.4. ábra A ferro vas metilglioxállal történő koinkubácója nem növelte az oxidatív stresszt (p>0,05), és szignifikánsan kisebb intracelluláris kálcium-akkumulációt okozott, mint a metilglioxál önmagában (p<0,05). \Box = oxidatív stressz, \blacksquare = intracelluláris kálcium-koncentráció, Fe=ferro vas, MG=metilglioxál (átlag ± SD, n=6).

Az 5.7.2.3.1.5. ábra azt mutatja, hogy mindegyik antioxidáns csökkentette vvt-kben a ferro vas által indukálta oxidatív stresszt (felső panel) és az intracelluláris kálcium-akkumulációt (alsó panel).

dc 360 101



5.7.2.3.1.5. ábra Az antioxidánsok hatása a ferro vas által kiváltott oxidatív stresszre (felső panel) és az intracelluláris kálcium-akkumulációra (alsó panel). Az alsó panelen a kataláz hatását nem ábrázoltuk, mivel a kataláz interferált a Fura-2-AM fluoreszcenciájával. SOD=szuperoxid dizmutáz; deferriox= dezferrioxamin mezilát; GSH=redukált glutation (p<0,05 a ferro vas vs. ferro vas+Trolox tekintetében az alsó panelen; minden más esetben p<0,001 a ferro vas vs. a ferro vas+scavenger tekintetében; átlag \pm SD, n=6).

Az MG-vel és vvt-kkel kapott eredményeket az 5.7.2.3.1.6. ábra mutatja (felső panel oxidatív stressz, alsó panel intracelluláris kálcium-akkumuláció). Az általunk használt összes antioxidáns csökkentette az oxidatív stresszt és az intracelluláris kálcium-akkumulációt, amelyeket az MG idézett elő a vvt-kben. A kataláz Fura-2-AM-mel fellépő interakciója itt is tapasztalható volt, ezért ezek a mérések nem értékelhetők.

dc_360_10%





5.7.2.3.1.6. ábra Az antioxidánsok gátolták a metilglioxál által kiváltott oxidatív stresszt (felső panel) és az intracelluláris kálcium-akkumulációt (alsó panel). A kataláz-Fura-2-AM-interakció miatt ezek a mérések nem kerültek feltűntetésre. SOD=szuperoxid dizmutáz; deferriox=dezferrioxamin mezilát; GSH=redukált glutation (p<0,01 az MG vs. MG+kataláz és az MG+SOD+kataláz esetében a felső panelen, minden más esetben p<0,001 az MG vs. MG+scavenger tekintetében; átlag ± SD, n=6).

5.7.2.3.2. A metilglioxál redukálja a ferri vasat

Azt tapasztaltuk MG-vel és vvt-vel végzett kísérleteinkben, hogy az MG által kiváltott oxidatív stresszt és kálcium-akkumulációt a ferri vasat komplexáló – és így a ferro vassá történő átalakulást gátló – dezferrioxamin jelentősen csökkentette. Másrészt, az MG és ferro vas koinkubációja nem volt additív hatású, sőt a kálcium-akkumuláció szempontjából a ferro+MG hatása kisebb volt, mint az MG önmagában. Mindezek alapján feltételeztük, hogy az MG interakcióba lép a vassal és esetleg redukálhatja a ferri vasat ferrová. Az MG kiváltotta ferri vasredukciót az 5.7.2.3.2.1. ábra mutatja. Látható, hogy a
vasredukciót a dezferrioxamin teljesen meggátolta. MG által kiváltott ferro vasoxidáció nem volt igazolható (ábrán nem mutatott eredmények).



5.7.2.3.2.1. ábra A metilglioxál időfüggő ferri vasredukciót kiváltó hatása. \blacklozenge =metilglioxállal, \Box =metilglioxál nélkül, Δ = metilglioxál+dezferrioxamin mezilát (5 független kísérlet átlagai).

5.7.2.3.3. Az L-arginin-metilglioxál ESR spektruma vassal és vas nélkül

A következő, az 5.7.2.3.3.1. ábra azt mutatja, hogy az L-arginin a metilglioxállal szabadgyökös reakcióba lép (A spektrum). A B spektrum azt demonstrálja, hogy a ferri vas (10 mM) növeli és a C spectrum szerint pedig a ferro vas (szintén 10 mM) csökkenti a gyökkoncentrációt.



5.7.2.3.3.1. ábra Az L-arginin-metilglioxál reakcióban termelődő szabad gyökök ESR jelintenzitását a ferri vas növeli és a ferro vas csökkenti. A: metilglioxál+L-arginin; B: A + 10 mM ferri vas; C: A + 10 mM ferri vas; C: A + 10 mM ferro vas. A scan width 100 G volt.

A ferri vas koncentrációfüggő-növekedést, a ferro vas csökkenést váltott ki (5.7.2.3.3.2. ábra). Öt mM-os végkoncentrációnál a vas elérte hatásmaximumát.



5.7.2.3.3.2. ábra A ferri vas koncentráció-függően növelte, a ferro pedig csökkentette az ESR

jelintenzitását. A pontozott vonal mutatja a ferri és a folytonos a ferro vas hatását.

Vaskomplexálókkal végzett vizsgálatainkban (5.7.2.3.3.3. ábra) a ferri vas növelte a jelintenzitást (B spektrum), amely hatást a dezferrioxamin mezilát, mint ferri vas kelátor, kivédett (C spektrum). Ferrozin tovább növelte a ferri vas-MG-L-arginin rendszerben képződő jelet (D spektrum), azaz a ferro vas eltávolítása a rendszerből további intenzitás-emelkedéshez vezetett (az MG hatására a ferri vasból képződött ferro vasat komplexálja a ferrozin).



5.7.2.3.3. ábra Vaskomplexálók hatása a metilglioxál-L-arginin-ferri vas rendszerben képződött ESR jel intenzitására. A: metilglioxál-L-arginine; B: A+ferri vas (5 mM); C: B+dezferrioxamin mezilát (10 mM); D: B+ferrozin (40 mM). Scan width = 100 G.

A ferro vas által okozott jelamplitúdó-csökkenés (5.7.2.3.3.4. ábra B spektrum) részben megelőzhető dezferrioxamin meziláttal (C spektrum), ami oxidálja a ferro vasat ferrivé, majd komplexálja azt, és megakadályozza a vas redox ciklusát. A ferrozin, a ferro vas komplexálója teljesen kivédte a ferro vas jelintenzitást csökkentő hatását (D spektrum).



5.7.2.3.3.4. ábra Vaskomplexálók hatása a metilglioxál-L-arginin-ferro vas rendszerben képződött ESR jel intenzitására. A: metilglioxál-L-arginin; B: A+ferro vas (5 mM); C: B+dezferrioxamin mezilát (10 mM); D: B+ferrozin (40 mM). Scan width = 100 G.

5.7.2.3.3. A metilglixál-L-arginin rendszerben képződött termék spektrofotometriás analízise

Az MG-L-arginin-vas rendszerben képződő barnulási termékek spektrofotometriás analízisét azért végeztük el, hogy megvizsgáljuk, a ferri és a ferro vas hatására képződött termékek spektruma különbözik-e (5.7.2.3.3.1. ábra)? A spektrumokat vas-L-arginin-MG rendszerben vettük fel L-arginin-MG-vel szemben. A 630 nm-nél detektált csúcs eltűnését és 490 nm-nél egy csúcs megjelenését észleltük. Az időfüggő spektrumokból kitűnik, hogy a 490 nm-nél mért csúcs a ferro vas hatására magasabb volt a ferri vasat tartalmazóhoz képest.

dc_360_113



5.7.2.3.3.1. ábra A metilglioxál-L-arginin rendszerben képződő színes termék spektrofotometriás analízise azt mutatja, hogy a vas elősegíti a spektrum képződését. A felső panel a ferro, a középső a ferri vas (mindkét esetben 10 mM) és metilglioxál-L-arginin jelenlétében kialakuló spektrumot mutatja, amit metilglioxál-L-argininnel szemben mértünk 10 perces periódusokban (a 490 nm-nél mért csúcs növekedett, a 630 nm-nél mért csökkent). Az alsó panel a 490 nm-nél mért csúcs változásának időfüggését mutatja a metilglioxál-L-arginin-ferro vas (A), metilglioxál-L-arginin-ferri vas (B) és a metilglioxál-L-arginin (C) rendszerben, amit L-argininnel szemben mértünk (reprezentatív spektrumai három független kísérletnek).

5.8. Vizsgálatok urémiás, hemodializált betegekben (XII,LVI)

5.8.1. Bevezetés

Mint már többször is említettük, végállapotú veseelégtelenségben (ESRD) a legmagasabb a glikációs végtermékek (AGE) szintje. Feltételezések szerint az AGE-k szerepet játszhatnak az ESRD-ben tapasztalható extrém magas mortalitás kialakulásában (265). Számos tanulmány igazolta az AGE-k patogenetikai szerepét az atherosclerosis létrejöttében (266,267). Az AGE-k atherogén hatását számos in vitro vizsgálatban tanulmányozták, de kevés klinikai tanulmányt végeztek. Ezért ESRD-ben a keringő szérum AGE-szintet sokáig nem fogadták el cardiovasculáris mortalitási kockázati tényezőként (268-271).

A következőkben az egyik AGE, a karboximetil-lizin (CML)-szintek és az általános és a cardiovasculáris mortalitás közti kapcsolatot mutatom be 154 hemodializált beteg esetében, követéses vizsgálat során.

5.8.2. Betegek és módszerek

5.8.2.1. Betegek

Hemodializált betegeket (n=154, 119 nem-diabeteses, 35 diabeteses) követtünk 2000 áprilisa és 2004 júliusa között. A vizsgálatba történő bevételkor a dialízisen töltött átlagos idő 42,3 (minimummaximum=1-211) hónap volt. A követés során a dialízis kezelés tartama minden betegnél meghaladta a 9 hónapot. A dialízis kezelés során használt membránok a következők voltak: 115 betegnél (75%) F5-highperformance steam (HPS), F6-HPS, F8-HPS low-flux poliszulfon és 39 betegnél (25%) F50-S, F60-S és HF80-S high-flux poliszulfon. A legtöbb beteg a szokványos gyógyszerelést kapta, azaz kálium- és foszfátkötőt, eritropoetint, vaspótlást, vitaminokat (B, C, és D), furosemidet és antihipertenzivumokat. A cardiovasculáris betegségek jelenlétéről a betegek klinikai dokumentációja alapján győződtünk meg. Az ischaemiás szívbetegség diagnózisát akkor állítottuk fel, ha a betegnél pozitív ergometria, koronarográfia, vagy lezajlott miokardiális infarktus, elvégzett PTCA vagy bypass műtét szerepelt. A perifériás vaszkuláris betegség definíciójaként a klaudikációt és a csökkent tapinthatóságú alsóvégtagi artériás pulzációt, valamint az invazív artériás beavatkozást fogadtuk el. Cerebrovaszkuláris betegségről akkor beszéltünk, ha az anamnézisben TIA, karotisz rekonstrukció vagy szignifikáns sztenózis szerepelt. Kiinduláskor a betegek 65%-ában volt jelen a három közül valamelyik cardiovasculáris betegség. Megelőző vagy aktuális dohányzás 31%-ban volt kideríthető. A kezdeti vizsgálatkor 65 egészséges önkéntes adatai szolgáltak kontrollként, akik a követésben nem vettek részt. Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatás-Etikai Bizottsága jóváhagyta.

5.8.2.2. Vérvételek és laboratóriumi vizsgálatok

Dialízis előtti vérmintákból történtek a meghatározások. Szérumalbumint, -B₂-mikroglobulint, karbamid nitrogént, -kreatinint, -C-reaktív proteint (CRP), hemoglobin A_{1c}-t, szérumösszkoleszterint és trigliceridet mértünk. A CML-meghatározásra félretett mintákat -70°C-on őriztük.

A CML-mérés a 2.1.2.2. fejezetben leírtak szerint történt.

5.8.2.3. Követéses vizsgálat

Minden 2000 áprilisában bevont beteget követtünk 2004 júliusáig vagy haláláig. A halál okát rögzítettük és két csoportra osztottuk: cardiovasculáris és nem cardiovasculáris halálozásra. A követés átlagosan (medián) 40 hónapja alatt (minimum-maximum = 1-51 hónap) 17 beteg került transzplantációra, akiknek az adatait a transzplantációig követtük.

5.8.2.4. Statisztikai vizsgálat

Az eredményeket átlag \pm SD formában adtuk meg. A változók eloszlásának normalitásáról Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával nyertünk képet. A változók túlnyomó többsége - a szérumkreatinin kivételével – nem-normális eloszlású volt. Ezért a szérumkreatinin esetében *t* tesztet, egyébként nem-parametrikus Mann-Whitney *U* tesztet használtuk. Korrelációs vizsgálatra a nemparametrikus Spearman-tesztet használtuk. A túlélést Kaplan-Meier-analízissal tanulmányoztuk és Coxregressziót alkalmaztunk. Az egyváltozós analízisben szignifikánsnak bizonyulókat tartalmazta a sokváltozós analízis.

5.8.3. Eredmények

A szérum-CML-szint ötször magasabb volt a dializált betegek esetében, mint a kontrollokban (5.8.3.1. táblázat).

constitutututut 11 nemoututujuti belegen es a nontrotion minimat jenemijoi							
	Betegek	Kontroll					
	(n = 154)	(n = 65)					
Kor (év)	$59,4 \pm 15,8$	$41,8 \pm 14,0^{a}$					
Nem (férfi/nő %)	46/54	55/45					
Testsúly (kg)	$64,2 \pm 13,8$	$73,2 \pm 13,5$ ^a					
Szérumkreatinin (µmol/l)	822 ± 221	97 ± 18^{a}					
Szérumalbumin (g/l)	38 ± 3	47 ± 2^{a}					
Szérum-C-reaktív protein (mg/l)	18 ± 26	2 ± 2^{a}					
Szérum-CML (ng/mg protein)	$24,8\pm9,7$	5.0 ± 1.8 ^a					

5.8.3.1. táblázat A hemodializált betegek és a kontrollok klinikai jellemzői

Átlag \pm SD. ^ap < 0,001.

A hemodializáltak öregebbek voltak, szérumkreatinin- és -CRP-szintjük magasabb, szérumalbumin-szintjük és testsúlyuk alacsonyabb volt, mint a kontrolloké. A nemi megoszlás hasonlónak bizonyult. A nők és a férfiak szérum-CML-szintje között nem tapasztaltunk különbséget.

A diabeteses betegek (n = 35) szérum-CML-szintje (22,5 \pm 8,3 ng/mg protein) hasonló volt, mint a nem-diabeteseseké (25,5 \pm 10,0 ng/mg protein). Nem találtunk kapcsolatot a szérum-CML-szint és a hemoglobin A_{1c} között.

A szérum-CML-szint az alapállapotban már cardiovasculáris betegségben szenvedő dializáltakban nem volt magasabb (25,8 \pm 10,2 ng/mg protein, n = 100), mint a cardiovasculáris betegségtől mentesek esetében (23,0 \pm 8,3 ng/mg protein).

A szérum-CML-szint inverz korrelációt mutatott a reziduális vizelet mennyiségével (r=-0,279, p<0,001), szignifikáns pozitív korrelációban állt a szérum- β_2 -mikroglobulin-szinttel (r=0,196, p<0,05) és a dialízisprogramban töltött idővel (r=0,158, p<0,05). A β_2 -mikroglobulin is negatív korrelációt mutatott a reziduális vizeletmennyiséggel (r=-0,394, p<0,001) és szignifikáns pozitív korrelációban állt a dialízisprogramban töltött időtartammal (r=0,309, p<0,001). A reziduális vizelet mennyiség és a dialízisprogramban töltött idő negatívan korrelált egymással (r=-0,416, p<0,001). Nem volt szignifikáns korreláció a hemodializáltak esetében a szérum-CML-szint és a kor, a CRP, a szérumalbumin, a szérumkarbamid nitrogén, a szérumkreatinin és a testtömegindex között.

A követés 51 hónapja alatt 74 beteg (48%) halt meg. Hatvankét százalékuk cardiovasculáris és 38%-uk nem-cardiovasculáris okok miatt exitalt. Az átlagos túlélés a tanulmány kezdetétől számított 37 hónap volt. A túlélés időtartama rövidebbnek bizonyult a bevonáskor cardiovasculáris betegségben szenvedők esetében, mint az attól menteseknél (33 és 46 hónap, p<0,001), a bevonáskor diabetes

mellitusban szenvedőknél (34 és 38 hónap, p<0,05), a magas CRP-vel (≥ 10 mg/l) rendelkezők esetében (33 és 41 hónap, p<0,05) és azoknál, akiknél a szérum-CML-szint a medián (23,8 ng/mg protein) fölötti volt (34 és 40 hónap, p<0,01).

A szérum-CML-szint mediánja a betegeket két csoportra osztotta, alacsony és magas CMLszintűekre. A CML-medián feletti betegek csoportjában magasabb volt az összmortalitás (0,58 és 0,38, p<0,01, 5.8.3.2. ábra) és a cardiovasculáris mortalitás is (0,36 és 0,23, p<0,05, 5.8.3.1. ábra), mint a medián alatti csoportban.



5.8.3.1. ábra Az összhalálozás kumulatív incidenciája az 51 hónapos követés során a szérum-CMLszint mediánja alatti (alacsony CML) és fölötti (magas CML, p<0,01) csoportban.

dc_360_118



5.8.3.2. ábra A cardiovasculáris halálozás kumulatív incidenciája az 51 hónapos követés során a szérum-CML-szint mediánja alatti (alacsony CML) és fölötti (magas CML, p<0,05) csoportban.

A CML-medián szerinti két csoport betegeinek klinikai jellemzőit az 5.8.3.2. táblázat tartalmazza.

5.8.3.2. *táblázat A szérum CML-medián alatti és feletti betegek csoportjainak klinikai jellemzői.* Átlag ± SD. ^ap<0,05, ^bp<0,001, ^cp<0,01.

	Szérum CML ≤ medián	szérum CML > medián		
	(n = 77)	(n = 77)		
Kor (év)	$58,3 \pm 15,5$	$60,6 \pm 16,1$		
Nem (férfi/nő, %)	47/53	46/54		
Testtömegindex (kg/m ²)	$24,3 \pm 4,8$	$23,5 \pm 3,8$		
Szérumalbumin (g/l)	38 ± 4	38 ± 3		
Szérumkreatinin (µmol/l)	796 ± 212	857 ± 230		
Szérum-C-reaktív protein (mg/l)	17 ± 25	19 ± 26		
Szérumösszkoleszterin (mmol/l)	$4,5 \pm 1,0$	$4,4 \pm 1,1$		
Szérumtriglicerid (mmol/l)	$2,0 \pm 1,2$	$1,9 \pm 1,1$		
Dohányos (%)	27,3	33,8		
Diabetes mellitus (%)	26,0	19,5		
Kiindulási cardiovasculáris betegség (%)	58,4	71,4		
Dialízisprogramban töltött idő (hónap)	$34,8 \pm 33,4$	$49,7 \pm 41,3^{a}$		
Reziduális vizeletmennyiség (ml/nap)	749 ± 627	$382\pm453^{\text{ b}}$		
β ₂ -mikroglobulin (mg/l)	19 ± 11	25 ± 15 ^c		
Szérum-CML (ng/mg protein)	$17,8 \pm 4,1$	31,8 ± 8,5 ^b		

Egy- és többváltozós Cox-regressziós analízisünk eredményeit az 5.8.3.3. táblázat mutatja be.

5.8.3.3. táblázat Egy- és többváltozós túlélési Cox analízis

	Egyváltozós analízis			Többváltozós analízis		
Változó	Hazard Rate Ratio	95%-os megbízhatósági tartomány	Szigni- fikancia	Hazard Rate Ratio	95%-os megbízhatósági tartomány	Szigni- fikancia
Kor (évenkénti növekedés)	1,043	1,024-1,061	< 0,001	1,056	1,026-1,088	< 0,001
Kezdeti cardiovasculáris betegség	4,235	2,172-8,257	< 0,001	2,533	1,217-5,272	< 0,05
Szérum-CRP (per mg/deciliter növekedés)	1,010	1,003-1,016	< 0,005	1,017	1,008-1,025	< 0,001
Magas szérum-CML	1,868	1,170-2,982	< 0,01	1,776	1,051-3,001	< 0,05
Szérumalbumin (per g/deciliter növekedés)	0,910	0,856-0,967	< 0,005	0,917	0,850-0,989	< 0,05
Szérumkreatinin (per mg/deciliter növekedés)	0,998	0,997-1,000	< 0,05	1,000	0,999-1,002	NS
Diabetes mellitus	1,724	1,053-2,822	< 0,05	1,284	0,739-2,232	NS
Dohányzás	0,857	0,517-1,420	NS	3,03	1,483-6,191	< 0,005
Férfi nem	1,391	0,880-2,197	NS	1,413	0,806-2,476	NS
Oligo-anuria	0,916	0,579-1,449	NS	0,574	0,320-1,031	NS

^ap<0,001, ^bp<0,005, ^cp<0,05. Oligo-anuria = vizeletmennyiség kevesebb, mint 500 ml/nap.

Az összhalálozás korrigált kockázata (hazard rate ratio) 1,78 volt (95%-os megbízhatósági intervallum, 1,05 – 3,01) a magas CML-csoportban (p<0,05; 5.8.3.3. ábra).



5.8.3.3. ábra Az összmortalitás korrigált kumulatív kockázata az alacsony (medián alatti) és a magas (medián fölötti) CML-szintű betegcsoportokban. Többváltozós Cox modellel, p<0,05, Korrekciós tényezők: kor, dohányzás, szérum-CRP, szérumalbumin, szérumkreatinin, kezdeti cardiovasculáris betegség, diabetes mellitus és oligo-anuria.

5.9. Dohányzás, oxidatív- és karbonil stressz in vitro

5.9.1. Dohányfüst hatása a cGMP termelésre endotélsejtekben (XIII)

5.9.1.1. Bevezetés

Ebben a munkánkban a dohányfüst károsító hatását vizsgáltuk az endotélsejtek NO-guanilát cikláz-cGMP rendszerében keletkező cGMP-termelésre. Annak megbecsülésére, hogy hol károsodhat a rendszer indirekt (A23187 és bradikinin) és direkt (nátrium nitroprusszid) guanilát cikláz-stimulátorokat is használtunk. Feltételezve, hogy a cigarettafüst szabadgyök-tartalma felelős a károsodásért a kísérletek második felében különböző antioxidánsokkal, úgynevezett gyökfogókkal megpróbáltuk a károsodást kivédeni. Elsősorban tiol-csoportot tartalmazó gyökfogókat használtunk.

Végül annak ismeretében, hogy az aldehidek a szabad gyökök toxikus hatását potencírozhatják az egyik legagresszívabb aldehid, a formaldehid előfordulását is megvizsgáltuk, majd koncentrációját is meghatároztuk a cigarettafüstben.

5.9.1.2. Anyagok és módszerek

dc_{360}^{121}

5.9.1.2.1. Aortaendotélsejt-kultúrák

Az endotélsejteket disznó aortákból izoláltuk collagenáz enzimmel (200 mg/100 ml, 20 percig 37° C-on). A sejteket Media 199-ben (Gibco) tenyésztettük, ami 20 %, hővel inaktivált fötális borjú szérumot, penicillint (100 U/ml), streptomycint (100 μ g/ml) és L-glutamint tartalmazott. Az induló sejtszám 1x10⁵ sejt/cm² volt. A vizsgálatokhoz konfluáló sejteket tartalmazó primer kultúrákat használtunk.

5.9.1.2.2. Dohányfüst tartalmú puffer ("dohánypuffer, SB") készítése

A dohányfüst előállításához füstszűrős cigarettát használtunk. Egyetlen cigaretta füstjét 5 ml foszfodieszteráz-gátlót (IBMX, 10 µmol/l) is tartalmazó Krebs pufferen áramoltattuk át. Az így nyert "dohánypuffer" (SB-vel rövidítettük) különböző koncentrációival kezeltük az endotélsejteket.

5.9.1.2.3. Kísérletes protokoll

Az endotélsejteket 2-100 % SB-t tartalmazó médiával preinkubáltuk 30 percig. A preinkubáció után a sejteket A23178-el (1 μmol/l) vagy bradikininnel (0,1 μmol/l) inkubáltuk 3 percig, hogy az eNOS enzim aktiválásával az NO termelést fokozzuk a sejtekben. Emellett további sejttenyésztő edényekben az endotélsejteket nátrium nitroprussziddal (1 mmol/l) is kezeltük 3 percig, melynek során a felszabaduló NO stimulálja a guanilát ciklázt. A reakció végén jéghideg HCl-t (0,1 mol/l-es végkoncentrációban) adtunk a tenyészedények mindegyik vályujába, hogy az enzimatikus reakciót leállítsuk és az intracelluláris cGMP-t extraháljuk. Az 1 órás inkubálás után a felülúszót leszívtuk és -20°C-on tartottuk a cGMP meghatározásáig.

Az antioxidánsok hatásának vizsgálatakor a különböző koncentrációjú SB-vel együtt a sejteket a különböző antioxidánsok egyikével is inkubáltuk a következő concentrációkban: szuperoxid dizmutáz (SOD, 100 E/ml), kataláz (110 E/ml), redukált glutation (GSH, 50 μmol/l, 2 mmol/l vagy 5 mmol/l), vagy dezferrioxamin mezilát (DFO, 0,3 mmol/l).

5.9.1.2.4. A cGMP mérése

Az intracelluláris és a sejtek felülúszójában megjelenő extracelluláris cGMP-t együttesen mértük RIA-val a New England Nuclear kitjét használva a kitben megadott módszer kisfokú módosításával. A cGMP mennyiségét minden esetben a sejtek fehérje tartalmához viszonyítottuk, amit Lowry módszerrel határoztunk meg (272).

5.9.1.2.5. Dohányfüst formaldehid mennyiségének mérése

$dc_{360}12$

A dohánypufferben a formaldehid mennyiségét Nash módszerével határoztuk meg (273). Az eredmények értékelésénél formaldehid standard sor segítségével állapítottuk meg a termelt formaldehid mennyiségét.

5.9.1.2.6. Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlag \pm SD formájában tüntettük fel. Az egyes értékek összehasonlítása kétmintás t próbával történt.

5.9.1.3. Eredmények

5.9.1.3.1. Alap és stimulált cGMP mennyisége

Az A23187 (a kálciumbeáramlásának létrehozása révén), a bradikinin (receptor aktiváció útján) és a nátrium nitroprusszid (a guanilát cikláz direkt aktiválása következtében) növelte az endotélsejtek cGMP termelését (az irodalommal megegyező, ábrán nem mutatott eredmények).

5.9.1.3.2. A dohányfüstpuffer koncentráció- és időfüggő hatása, formaldehid tartalma

Az SB endotélkárosító hatásának megítélésére először különböző mennyiségű SB-vel kezeltük a sejteket azonos ideig (30 perc), majd A23187-tel vagy bradikininnel aktiváltuk a sejtek NO-termelését, illetve közvetlenül stimuláltuk nátrium nitroprussziddal a guanilát ciklázt. Az 5.9.1.3.2.1. ábra mutatja, hogy a 2, 5 vagy 10%-os dohánypuffernek csak minimális károsító hatása volt, de 50 vagy 100%-os dohánypufferrel való inkubáció után szignifikánsan csökkent a bradikinin hatására keletkezett cGMP mennyisége. Hasonló eredményeket kaptunk A23187-tel is (ábrán nem mutatott eredmények). A guanilát cikláz nátrium nitroprussziddal történő direkt stimulálása esetén már 10 % dohánypufferrel való inkubáció esetén is megfigyelhető volt a cGMP mennyiségének szignifikáns csökkenése (p<0,05, ábrán nem mutatott eredmény).

 dc_{360}^{12}



5.9.1.3.2.1. ábra A dohányfüstpuffer (SB) koncentráció-függő cGMP-termelés-csökkenést okozott. BK = bradikinin. p<0,01 az 50 és a 100%-os higítás esetén vs BK.

A következőkben azonos koncentrációjú SB-vel (50%-os oldatot választottuk, ami a koncentráció görbék felvételénél 30' alatt minden esetben szignifikáns károsodást okozott) különböző ideig (10, 20 vagy 30 perc) kezeltük a sejteket az A23187-el vagy bradikininnel vagy nátrium nitroprussziddal történő 3 perces stimulálás előtt. A várakozásnak megfelelően, az idő növelésével a károsodás foka mindhárom sorozatban nőtt, a bradikininnel végzett vizsgálatokat mutatjuk be (5.9.1.3.2.2. ábra).

A23187- és SNP-stimuláció esetén az SB a 20. és a 30. percben okozott szignifikáns csökkenést a cGMP termelésben (ábrán nem mutatott eredmények).

Egy cigaretta vizes oldata 0,73±0,16 µmol formaldehidet tartalmazott.

 dc_{360}^{121}



5.9.1.3.2.2. ábra A dohányfüst (SB) időfüggően csökkenti az endotholsejtek cGMP termelését bradikinin stimuláció esetében. (50 %-os SB higítás, p<0,01 a 10. perctől)

5.9.1.3.3. Antioxidánsok hatása a dohányfüst okozta endotélsejt-károsodásra

Az 5.9.1.3.3.1. ábra mutatja a GSH hatását a BK által kiváltott cGMP-termelésre. Látható, hogy 50 μmol/l GSH részben, 2 mM GSH azonban teljesen kivédte az endotélsejtek dohányfüst okozta károsodásából következő cGMP-csökkenést. Hasonló eredményeket kaptunk az A23187 és a nátrium nitroprusszid stimuláció esetében is. A NAC is hasonlóan viselkedett, koncentrációfüggően csökkentette az endotélsejtek dohányfüst-okozta károsodását.

Ugyanakkor a H₂O₂-t bontó kataláz, a szuperoxid szabad gyököt dizmutáló SOD és az irreverzibilis vaskomplexáló DFO (mely a hidroxil szabad gyök keletkezését gátolja) nem védte ki az endotélsejtek dohányfüst-okozta károsodását (ábrán vagy táblázatban nem mutatott eredmény).

 dc_{360}^{121}



5.9.1.3.3.1. ábra A redukált glutation (GSH) kivédi a bradikinin stimulálta (BK) cGMPtermelésre kifejtett dohányfüstpuffer (SB) gátlást. Mindkét GSH-t tartalmazó minta esetében p<0,01 vs BK+SB.

5.9.2. A dohányfüst gátolja a bradikinin kiváltotta kálciumbeáramlást az endotélsejtekbe. (XIV) 5.9.2.1. Bevezetés

Normális körülmények között az endotélsejtekben különböző hormonok hatására fokozódik a nitrogén-monoxid szintáz enzim konstitutiv formájának (eNOS) aktivitása, ami az NO termelődésen át vazodilatációhoz vezet. Ilyen hormon lehet pl. az acetilkolin és a bradikinin. Ezek a hormonok az endotél felszínén található caveolaris felszín receptoraihoz kapcsolódnak (274). A caveola olyan plazmamembrán lefűződés, amelynek citoplazmatikus felszínéhez kapcsolódik az eNOS (275), és amely szerepet játszik a kálciumbeáramlás létrejöttében is (276). Az eNOS agonista indukálta aktivációja azáltal következik be, hogy az agonista rövid ideig tartó intracelluláris kálciumkoncentráció-növekedést indukál (277). Ez a kálcium két úton kerülhet be a citosolba. Egyrészt az agonista okozta receptor-aktiváció hatására a G-protein-dependens foszfolipáz C aktiválódik, ami a foszfatidilinozotol-difoszfátot inozitol-1,4,5-trifoszfáttá (IP3) hidrolizálja, és ennek hatására megnyílik az endoplazmatikus retikulum IP3-érzékeny kálcium csatornája (278). Másrészt az endoplazmatikus retikulumból történő kálcium felszabadulás, még nem teljesen ismert mechanizmus révén, esetleg kálciumbeáramlási faktor hatására, megnyitja a plazmamembrán caveoláris régiójában található raktár-függő kálcium csatornát, amelyen keresztül az extracelluláris térből további kálciumbeáramlás jön létre (279). Többek között a membrán potenciál is szabályozza az agonista indukálta kálcium csatorna működését, úgy, hogy a depolarizációja inaktiválja a csatornát (280). Az

$dc_{360}1^{29}$

intracellulárisan megemelkedett kálciumkoncentráció hatására a kálcium nagyobb mértékben kötődik a kalmodulinhoz, a kálcium-kalmodulin komplex kapcsolódik az eNOS-hoz és aktiválja azt (275). Az endotélsejtekben az eNOS hatására keletkezett NO aktiválja az endotélsejt saját guanilát cikláz enzimét, ami cGMP termeléshez és az endotél működését befolyásoló citoszkeletális kontraktilis fehérjék állapotának megváltozásához vezet (281). Ugyanakkor az endotéliálisan keletkezett NO parakrin úton eljut az érfali simaizmokhoz is, ahol szintén cGMP termelést, és ezáltal relaxációt indukál, ami vazodilatációhoz vezet (282).

Az oxidatív stressz és a dohányfüst-modell között fennálló hasonlóság miatt az volt a hipotézisünk, hogy a dohányfüst is hatással van a thiol-dependens, agonista-indukálta kálciumbeáramlásra. Célkitűzésünk az volt tehát, hogy meggyőző bizonyítékokat nyerjünk arról, hogy a dohányfüst a thiol-status megváltoztatása révén gátolja a bradikinin-indukálta kálciumbeáramlást.

5.9.2.2. Anyagok és módszerek

5.9.2.2.1. Sejttenyésztés

Frissen preparált sertés aortából standard módszer szerint endotélsejteket nyertünk. A sejteket 10 % FCS-t, penicillint, streptomycint és L-glutamint tartalmazó M199-es jelzésű oldatban szuszpendáltuk, majd hatlyukú szövettenyésztő edényekbe osztottuk szét. Az edények aljára zselatinozott, kerek, 1 cm átmérőjű, üveg fedőlemezeket tettünk. A sejttenyészetet 8-10 nap eltelte után akkor használtuk fel, ha a fedőlemezeket konfluáló módon benőtték az endotélsejtek, amit mikroszkóppal ellenőriztünk és CD34 immunfluoreszcens-jelöléssel győződtünk meg arról, hogy valóban endotélsejtekből állt a tenyészet.

5.9.2.2.2. Intracelluláris kálcium-koncentráció mérése

A sejtek intracelluláris, diffúzibilis, ionizált kálcium-koncentrációjának mérésére Fura-2-AM-t használtunk (19). A Fura-2-AM-et 1 μM-os koncentrációban 30 percig 37°C-on inkubáltuk az endotélsejtekkel. A maradék, sejtek által fel nem vett Fura-2-AM-et mosással távolítottuk el. A mérések során a fedőlemezeket – felszínükön az endotélsejtekkel – helyeztük a fluoriméter kvarc küvettájába. A mérésekhez 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM glukóz és 10 mM HEPES (pH 7,4) tartalmú oldatot használtunk. A méréseket állandó keverés mellett, 37°C-on végeztük Hitachi F-4500 típusú fluoriméter felhasználásával. Méréseinket 340 és 380 nm-es excitációs és 510 nm-es emissziós hullámhosszon, 10 nm-es résszélességgel végeztük. Az intracelluláris kálciumkoncentráció változását a 340 nm-nél és a 380 nm-nél mért érték hányadosaként fejeztük ki (340/380). Az endotélsejtek kálciumkoncentrációjának növekedését 250 nM-os bradikininnel indukáltuk.

5.9.2.2.3. Dohányfüst puffer (smoking buffer, SB) készitése Megegyezett az előzőekben leírtakkal.

5.9.2.2.4. Az endotélsejtek kezelése

Koncentráció- és időgörbéket készítettünk, azaz a konfluáló endotélsejt-tenyészetet tartalmazó fedőlemezeket a mérés előtt azonos koncentrációjú SB higításával különböző ideig (5-40 perc) vagy az SB különböző higításaival (6,25-50 %) azonos ideig inkubáltuk 37 °C-on. A redukált glutation (GSH) hatását úgy vizsgáltuk, hogy a 25 %-os SB-be növekvő koncentrációjú (0,5-4,0 mM) GSH-t tettünk, és a sejteket ezekkel a pufferekkel kezeltük 30 percig. A sejteket mostuk, majd ezután végeztük a bradikinin indukciót.

5.9.2.2.5. A redukált glutation (GSH) és fehérjék tiol tartalmának mérése 5.9.2.2.5.1. Redukált glutation mérése:

A fluoreszcens o-ftálaldehides (OPA) módszert használtuk a GSH mérésére (Obrosova *et al.*, 2000). 50 %-os SB-vel vagy 80 μmol/l-es formaldehiddel 30 percig kezeltük az endotélsejteket, majd tripszin-EDTA kezeléssel felvettük a tenyésztő edényből. PBS-sel (pH 7,4) háromszor mostuk a sejteket, majd reszuszpenziót követően 2500g-vel 5 percig centrifugáltuk őket. A felülúszót leöntöttük és a sejteket jégen, 6%-os perklór savval 10 percig feltártuk. Újabb centrifugálást követően (1000g 5 percig) a felülúszót neutralizáltuk 5 mol/l-es K₂CO₃-mal (pH 6-7) és a precipitátumot (KClO₄) centrifugálással (1000g, 5 perc) eltávolítottuk. A perklór savas extraktumot 1 mol/l-es TRIS-szel (pH 8,1), ami 20 mmol/l-es EDTA-t is tartamazott, higítottuk és a fluoreszcenciát metanolban oldott, 10 mg/ml-es OPA-val hoztuk létre. A fluoreszcenciát 340 nm-es excitációs és 425 nm-es emissziós hullámhossznál mértük az OPA kezelés előtt és után. A két mérés különbségét vetettük össze GSH standard sorral (0,625 - 10 μmol/l).

5.9.2.2.5.2. Endotéliális fehérjék tiol tartalmának mérése

Az előző pontban leírt fluoreszcenciás módszert adaptáltuk az endotélsejtek fehérje-tiol tartalmának meghatározására is. A perklórsavas precipitátumot, a felülúszó eltávolítása után, 1%-os perklór savval reszuszpendáltuk jégen, majd 1 mol/l-es TRIS-szel (pH 8,1), ami 20 mmol/l-es EDTA-t is tartamazott teljesen visszaoldottuk a fehérjéket. A fluoreszcencia mérése ugyanúgy történt, mint a GSH esetében, és szintén GSH standardhoz hasonlítottuk a fehérjék tiol tartalmát.

A visszaoldott perklórsavas precipitátumból Lowry (272) szerinti fehérjemeghatározást végeztünk.

$dc_{360_{12}}$

A GSH esetében 7 független mérés eredményeit adtuk meg μmol/g fehérje mértékegységben. A fehérje-tiol meghatározások esetében is 7 független mérést végeztünk, és az eredményeket GSH μekvivalens/g fehérje mértékegységben adtuk meg. Az adatok átlagát és a SEM-et tűntettük fel.

5.9.2.2.6. Statisztikai analizis

A bradikinin által indukált kálciumkoncentráció-változás amplitúdójának maximumát mértük le, és a kontroll (SB-t nem tartalmazó) minta amplitúdóját 100 %-nak véve, százalékosan fejeztük ki a dohányfüst hatását. Öt független vizsgálat átlagát és az SD-t vagy az SEM-et számoltuk ki. A statisztikai szignifikanciát kétmintás *t* próbával ellenőriztük.

5.9.2.3. Eredmények

A bradikinin-kiváltotta kálciumbeáramlást a 6,25 %-os hígítású SB nem befolyásolta, de az SB koncentrációjának növekedésével a kálciumbeáramlás fokozatosan csökkent (5.9.2.3.1. ábra, eredeti regisztrátumok). Az 5.9.2.3.2. ábra B panelje azt mutatja, hogy a kontroll, dohányfüstöt nem tartalmazó mintát 100 %-nak véve, az 50 és a 25 %-os hígítású SB szignifikánsan (p<0,001 mindkettő esetében) csökkentette a bradikinin kiváltotta kálciumbeáramlást.

 $dc_{360}12$



5.9.2.3.1. ábra A dohányfüst csökkenti a bradikinin indukálta kálciumbeáramlást. A=kontroll, B=6,25; C=12,5; D=25; E=50 %-os dohányfüst puffer higítás, lefelé mutató nyíl=bradikinin.



5.9.2.3.2. ábra Az 50 és a 25 %-os dohányfüsthígítás szignifikánsan (p < 0,001) csökkenti a bradikinin indukálta kálciumbeáramlást (n=5, átlag \pm SD). A kontroll értékét 100 %-nak vettük.

A 25 %-os SB hígítás időfüggően gátolta a bradikinin-kiváltotta kálciumbeáramlást a kontroll, SB-t nem tartalmazó pufferhez képest. Az 5.9.2.3.3. ábrán látható, hogy az SB már a 10. percben szignifikánsan csökkentette a bradikinin-indukálta kálciumbeáramlást.

dc_360_139



5.9.2.3.3. ábra A 25 %-os dohányfüstpuffer-hígítás időfüggő gátlása a bradikinin-indukálta kálciumbeáramlásra a 10. perctől kezdve szignifikáns volt (n=5, átlag±SD, p<0,001). A kontroll értékét 100 %-nak vettük.

A GSH hatását a 25 %-os SB hígítás 30 perces inkubációja esetében vizsgáltuk. A vizsgálati eredményeket az 5.9.2.3.4. ábrán összegeztük. Látható, hogy a 2 mmol/l-es és a 4 mmol/l-es koncentrációjú GSH-t tartalmazó SB hatására a kálciumbeáramlás növekedése szignifikánsan magasabb volt a GSH-t nem tartalmazó SB-vel kezelt sejtekben mért átlagnál.

 dc_{360}^{131}



5.9.2.3.4. ábra A redukált glutation kivédi a 25 %-os dohányfüst hatását (n=5, átlag±SD, p<0,05 a 2, p<0,01 a 4 mmol/l GSH esetében a dohányfüst puffer kontrollal összevetve). A kontroll értékét 100 %-nak vettük.

A formaldehid jelenlétét igazoltuk a dohányfüstben. Ezért megvizsgáltuk, hogy a fomaldehid hogyan hat az endotélsejtek kálcium áramaira. Eredményeinket az 5.9.2.3.5. ábrán mutatjuk be. Ezek alapján a formaldehid koncentrációfüggően gátolja az agonista indukálta kálciumbeáramlást. A formaldehidnek ez a hatása redukált glutationnal csökkenthető.

 $dc_{360_{131}}$



5.9.2.3.5. ábra A GSH kivédte a formaldehid hatását (n=5, p<0,05 kontroll vs. 10, 20, 40, 80µmol/l formaldehid, és 80µmol/l formaldehid vs. 80µmol/l formaldehid+4mmol/l GSH).

Vizsgáltuk, hogy a dohányfüst és a formaldehid hogyan befolyásolja az endotélsejtek intracelluláris redukált glutationszintjét. Eredményeink szerint, amelyet az 5.9.2.3.6. ábra mutat, a dohányfüst szignifikánsan csökkentette az intracelluláris redukált glutation koncentrációját.

dc_360_131



5.9.2.3.6. ábra A dohányfüst csökkenti az intracelluláris redukált glutation (GSH) koncentrációját. N=5, átlag±SEM, *:p<0,001 dohányfüst puffer (SB) vs. control. Az SB 50%-os higítását és a formaldehid 80 µmol/l-es koncentrációját használtuk a 30 perces inkubáció során.

Az intracelluláris redukált glutation koncentrációja befolyásolja az -SH enzimek működését. Megmértük azt is hogyan változott az endotélsejtekben a fehérje-tiol koncentrációja. A dohányfüst puffer hatására a fehérje-tiol koncentráció szignifikánsan csökkent, a formaldehid viszont nem befolyásolta azt (5.9.2.3.7. ábra).



5.9.2.3.7. ábra A dohányfüst puffer csökkenti az endotélsejtek fehérje-tiol csoport tartalmát. N=5, átlag±SEM, **:p<0,05 SB vs. control. Az SB 50%-os higítását és a formaldehid 80 µmol/l-es koncentrációját használtuk a 30 perces inkubáció során. SB=dohányfüst puffer.

5.9.3. A dohányfüst megváltoztatja az endotéliális nitrogén-monoxid szintáz foszforilációját: a protein kináz C szerepe (**XV, XLVIII, LXIV**)

5.9.3.1. Bevezetés

Az endotéliális NOS (eNOS) aktivitását poszttranszlációs foszforilációk is szabályozzák, pl. a Ser(1177) és a Thr(495) aminosavon. Ezekben a vizsgálatokban azt tanulmányoztuk, hogy az akut dohányfüsthatás hogyan befolyásolja az eNOS foszforilációját és van-e ebben szerepe a protein kinázoknak (PK).

5.9.3.2. Módszerek

5.9.3.2.1. Sejtkultúra

Egér endotélioma sejtvonalat (EC) használtunk, amit a LGC Promochem-től rendeltünk (Taddington, UK). Az EC 3-10. passzázsát használtuk. Az EC-t Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) tenyésztettük; Gibco, Csertex, Budapest), amelyet kiegészítettünk 10% fötális bovin szérummal és 2%-os penicillin-streptomycinnel. Az EC-t inkubátorban 37°C-on és 5% CO₂-ben tartottuk. A tápoldatot kétnaponta cseréltük. Minden kezelés előtt az EC-t egy éjszakán keresztül szérumnélküli DMEM-ben tartottuk, amiben 4,5g/l glukóz, L-glutamine és piruvát is volt. Minden reagenst a Sigma-Aldrich-tól (Budapest) rendeltünk.

5.9.3.2.2. Dohányfüstpuffer (smoking buffer, CSB) készítése Megegyezett az előzőekben leírtakkal.

5.9.3.2.3. Az endotéliális sejtlizátum készítése

A konfluáló EC-t kétszer Krebs pufferrel (37°C-on) mostuk, hogy tápoldat nyomokban se maradjon rajtuk. A kontroll mintákat Krebs pufferrel (Control), a kezelteket dohányfüst-pufferrel (CSB) (a jelölt higításokban) 37°C-on és 5% CO₂ közegben inkubáltuk. Egy másik kísérletsorozatban redukált glutationt (GSH; 5mM, Krebs pufferben, 15 perc) használtunk antioxidáns előkezelésként. Egy harmadik sorozatban az EC-t szelektív cAMP-dependens PK-inhibitorral (H-89, a PKA gátlója; 10μ M); vagy szelektív phosphatidylinositol 3(PI3)-K-inhibitorral (LY-294002, a PKB/Akt gátlója; 100μ M), vagy szelektív PKC-inhibitorral (bisindolylmaleimid X-HCl; Ro-318425; 1μ M), vagy, végül a PKC-ß szuperszelektív gátlójával (ruboxistaurin; LY-379196; 30nM; Eli Lilly Company, IN, USA) kezeltük. A kezelés után az EC-t kétszer Krebs pufferrel mostuk, majd 100μ L/tenyésztő edény lízis pufferrel kezeltük (1,15% Triton X, 1M Tris-bázis, pH 7,4, 0,5 M EDTA, pH 8, 0,2 M EGTA, pH 7, 0,1 M DTT, 5 mg/mL PMSF, 0,1 M Na₃VO₄, 5mg/mL leupeptin, 5mg/mL aprotinin). Utána az EC-t mechanikusan felkapartuk és -70°C-on tároltuk.

5.9.3.2.4. SDS-PAGE- és Western blot analízis

Az EC-lizátumokat ultrahanggal 2 percig kezeltük, majd centrifugáltuk (10 perc, 13000rpm, 4°C). A minták fehérjetartalmát Bradford módszere szerint határoztuk meg és bovine szérumalbumin használtunk standardként. A mintákat oldottuk 100 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 4,0% SDS, 20% glicerol, 200 mM ditiotreitol, 0,2% bromfenolkékben. A mintákat (80-120 μ g protein) elektroforézissel elválasztottuk, 10 vagy 7,5% poliakrilamid gélben és transzferáltuk (puffer összetétele: pH 9-9,4, 38mM glicin, 48 mM Tris, 1 mM SDS és 20% methanol) nitrocellulóz membránba (Amersham-Biotech, AP Hungary Ltd., Budapest) 60 percen keresztül 200 mA-el a phospho(P)-eNOS és az eNOS és 150 mA-el a P-Akt és az Akt esetében. A dimer eNOS esetében a mintákat nem hevítettük az elektroforézis előtt és a gélt 4°C-on tartottuk a PAGE során.

A membránokat 5%-os "non-fat dry milk" (NFDM) segítségével blokkoltuk (1 órán át, szobahőmérsékleten, room temperature (RT)). A membránokat a következő monoklonális IgG antitestekkel inkubáltuk: anti-eNOS és anti-P(Ser473)-Akt (Cell Signaling, Kvalitex Ltd., Budapest), anti-P(Thr495)-eNOS (BD Pharmingen, Soft Flow Hungary Ltd., Pécs), majd mostuk Tween 20 (TBS-T) tartalmú TRIS-pufferelt fizsóval és peroxidázzal konjugált IgG szekunder antitesttel inkubáltuk: poliklonális anti-nyúl (Cell Signaling, Kvalitex Ltd., Budapest) az anti-P(Ser1177)-eNOS, anti-P(Ser473)-Akt és IgG₁ esetében, illetve poliklonális anti-egér antitesttel (Zymed Laboratories Inc., Csertex, Budapest) az anti-P(Thr495)-eNOS esetében.

A Western blotok "strippelés-e" után a teljes eNOS-t (BD Pharmingen, Soft Flow Hungary Ltd., Pécs, Hungary), vagy a PKB/Akt-t (Cell Signaling, Kvalitex Ltd., Budapest, Hungary) mutattuk ki. A "strippelést" a következőképpen végeztük: A blot-okat TBS-T-vel mostuk 5 percig, utána inkubáltuk 100 mM glicin pufferben (pH 2,5) 20 percig, majd 500 mM Tris pufferben (pH 7,38; PBS-sel preparálva) 10 percig, végül ismét TBS-T-ben mostuk. A detektálást enhanced chemiluminescence módszerével végeztük (ECL; Pierce Biotech, Bio-Rad, Budapest). Komputerizált denzitometriát használtunk (integrated optical density) és a specifikus band-eket Scion Image for Windows Software-rel analizáltuk. Az eredményeket a totális eNOS-ra, vagy Akt-ra, illetve a kontrollokra korrigáltuk.

5.9.3.2.5. Statisztika

Az eredményeket átlag ± SEM formában adtuk meg. ANOVA-t vagy Student's t-tesztet illetve a tendenciák analízisére Jonckheere-Terpstra tesztet használtunk. Az SPSS 13.0-ás verzióját alkalmaztuk.

5.9.3.3. Eredmények

5.9.3.3.1. A CSB elősegíti az eNOS foszforilációját mind a Ser(1177), mind a Thr(495) pozícióban

A CSB-kezelés növelte mind a foszfo-Ser(1177)-eNOS, mind a foszfo-Thr(495)-eNOS intenzitását- koncentráció (5.9.3.3.1.1. ábra A panel: Ser(1177): p < 0,01; Thr(495): p < 0,05 a trendre) és időfüggő módon (B panel: p < 0,05 a trendre, mindkét foszforilációs pozícióra).

Figyelemreméltó azonban, hogy a CSB hatására a foszfo-Thr(495)-eNOS intenzitása minden koncentráció mellett és időpontban nagyobb volt, mint a foszfo-Ser(1177)-eNOS-é (A és B, p < 0,05).



5.9.3.3.1.1. ábra A dohányfüst-puffer (CSB) által kiváltott eNOS foszforilációs változások. Az endotélsejteket a CSB növekvő koncentrációival (5-10-50%, 30min *A panel*) vagy 50%-os CSB-vel különböző ideig kezeltük (5-10-20-30min, *B panel*). Az ábra bemutatja, hogy CSB hatására mind a foszfo-Ser(1177)-eNOS (\bigotimes), mind a foszfo-Thr(495)-eNOS (\bigotimes) intenzitása növekedett koncentráció- ($\stackrel{#}{=}:p < 0,01; \stackrel{\$:}{=}:p < 0,05$ vs. control) és időfüggő módon ($\stackrel{\&:}{=}:p < 0,05; \stackrel{\$:}{=}:p < 0,05$ vs. control). Mindazonáltal az is megfigyelhető, hogy foszfo-Thr(495)-eNOS intenzitás nagyobb volt, mint a foszfo-Ser(1177)-eNOS minden koncetráció (*A panel*) és minden időpont esetében (*B panel*) ($\stackrel{\&:}{=}:p < 0,05$). Az ábra felső panelei reprezentatív Western blot képeket mutatnak. (n = 5).

5.9.3.3.2. A GSH csökkenti a CSB-okozta eNOS-foszforilációt

Az 5.9.3.3.2.1. ábra azt mutatja, hogy a GSH (mint nem specifikus antioxidáns) 20%-kal csökkente a Ser(1177)és 45%-kal a Thr(495) foszforilációját (p < 0.05 vs. CSB GSH nélkül). A GSH kiváltotta

csökkenés szignifikánsan kifejezettebb volt a Thr(495) pozícióban, mint a Ser(1177) pozícióban (p < 0,05).



5.9.3.3.2.1. ábra A GSH csökkenti a CSB-okozta eNOS-foszforilációt. A GSH csökkenti a CSB (20%, 30min) okozta foszforilációt mind a Ser(1177), mind a Thr(495) pozícióban. A GSH a Ser(1177) aminosavon (B) 20%-kal, a Thr(495) aminosavon (\fbox{D}) 45%-kal csökkenti a foszforilációt. (*:p < 0,05 vs. CSB). A GSH kiváltotta csökkenés szignifikánsan kifejezettebb volt a Thr(495), mint a Ser(1177) pozícióban ($\ddagger: p < 0,05$). Az adatok a kontrollra és a totál eNOS-ra is korrigáltak (n = 5).

5.9.3.3.3. A CSB az aktív dimer eNOS szétesését okozza

Az EC dimer eNOS-a (270 kDa) CSB kezelés hatására koncentráció és időfüggő módon disszociál, mint azt az 5.9.3.3.1. ábrán láthatjuk az eNOS dimer/monomer aránya alapján. GSH-val történő előinkubáció (5mM, 15min) kivédte ezt a disszociációt.

dc_360_¹³



5.9.3.3.1. ábra A CSB az aktív dimer eNOS szétesését okozza. Az EC-ket növekvő CSB koncentrációnak (5-10-20-50%) tettük ki 20 percig (*A panel*), vagy 50%-os CSB hatott különböző ideig (5-10-20 perc; *B panel*). Az eNOS dimer/monomer aránya koncentráció- és időfüggő csökkenést mutatott (*:p < 0,001 vs. Control). A GSH kezelés kivédte a disszociációt ([#]:p < 0,05 vs. 50% CSB, 20min, N.S.: 50% CSB, 20min +GSH vs. Control). A felső panelek reprezentatív Western blot képeket mutatnak (n = 7).

5.9.3.3.4. A CSB csökkenti az Akt aktiváló foszforilációját

Az Akt aktiváló foszforilációjának pozíciója a Ser(473). A CSB kezelés koncentráció és időfüggően csökkentette a foszfo-Ser(473)-Akt intenzitását (5.9.3.3.4.1. ábra, p < 0.05 a trendre). A teljes Akt mennyisége nem változott (Control vs. bármely időpont, vagy koncentráció; N.S.).

dc_{360}^{131}



5.9.3.3.4.1. ábra A CSB csökkenti az Akt aktiváló foszforilációját. Az EC-ket növekvő koncentrációjú (5-10-50%, *A panel*) CSB-vel és 50%-os CSB-vel 5-10-20-30 percig (*B panel*) kezeltük. A CSB kezelés csökkentette az Akt aktiváló foszforilációját a Ser(473) pozícióban (*:p < 0.05 vs. Control). A felső panelek reprezentatív Western blotok képét mutatják (n = 5).

5.9.3.3.5. Protein kinázok hatása az eNOS CSB által kiváltott foszforilációs változásaira

A PKA szelektív gátlóját (H-89), a PI3-K (phosphatidylinositol-3-kinase)/Akt inhíbitorát (LY-294002) és a PKC gátlóját (Ro-318425) használtuk arra, hogy az egyes utak szerepét tanulmányozzuk a CSB kiváltotta eNOS foszforilációs-változásokban (Ser(1177) és Thr(495)). Alaphelyzetben, kontroll esetben az EC-k bazális Thr(495) foszforilációja magasabb volt, mint a Ser(1177) pozícióban (p < 0.05, 5.9.3.3.5.1. ábra A panel, és B panel). A PKA szelektív inhíbitora, a H-89 (10 μ M) nem befolyásolta a CSB kiváltotta foszforilációt. A LY-294002 (100 μ M) növelte a CSB okozta Ser(1177) foszforilációt (p < 0.05 vs. CSB, 5.9.3.3.5.1. ábra A panel), a Thr(495) pozícióban lévő foszforilációt azonban nem befolyásolta (5.9.3.3.5.1. ábra B panel). A PKC út szelektív gátlása Ro-318425-el (1 μ Mol/L) növelte a CSB által kiváltott Ser(1177) foszforilációt (p < 0.05 vs. CSB, 5.9.3.3.5.1. ábra A panel), a Thr(495) pozícióban viszont csökkentette azt (p < 0.001 Ser(1177) vs. Thr(495), 5.9.3.3.5.1. ábra C panel).





5.9.3.3.5.1. ábra Protein kinázok hatása az eNOS CSB által kiváltott foszforilációs változásaira. A CSB-vel kezelt (20%, 20perc) endotélsejteket (EC) előinkubáltuk a szelektív PKA inhibítor H-89-

cel (10 μ M); vagy a szelektív PKB/PI3-K (phosphatidylinositol-3-kinase) inhibítor LY-294002-vel (100 μ M) vagy a szelektív PKC inhibítor Ro-318425-tel (1 μ M) 30 percig. Alapállapotban, CSB nélkül az EC-k eNOS-foszforilációja kifejezettebb volt a Thr(495)(\blacksquare), mint a Ser(1177) (B) pozícióban (${}^{\$:}p < 0,05 \ A \ panel \ és \ B \ panel$). A CSB kezelés növelte mind a Ser(1177), mind a Thr(495) foszforilációját (${}^{*:}p < 0,001 \ vs.$ Control, A panel és B panel). A Ser(1177) pozícióban az eNOS foszforilációját nem befolyásolta a H-89, az LY-294002 azonban és a Ro-318425 növelte azt (${}^{#:}p < 0,05 \ vs.$ CSB, A panel). A Thr(495) pozició foszforilációját a H-89 vagy a LY-294002 nem befolyásolta, a Ro-318425 azonban szignifikánsan csökkentette azt (${}^{#:}p < 0,05 \ vs.$ CSB, B panel). Az eNOS foszforilációját mindkét pozícióban hasonlóképpen bofolyásolta a H-89 és a LY-294002, a Ro-318425 hatására azonban szignifikáns különbség alakult ki a Thr(495) és a Ser(1177) foszforilációja között (${}^{+:}p < 0,001 \ Ser(1177) \ vs.$ Thr(495), C panel, (n = 4). Az ábra felső része reprezentatív Western blot képeket mutat az eNOS Ser(1177) és Thr(495) foszforilációjáról és a total eNOS fehérjéről.

5.9.3.3.6. A PKCß specifikus gátlójának, a ruboxistaurinnak (Rbx) a hatása a CSB által kiváltott eNOS-foszforilációs változásokra

Az eNOS foszforilációját Rbx-el (30nM) befolyásoltuk növekvő CSB koncentrációk mellett (10-20-50%, 20 perc, 5.9.3.3.6.1. ábra). CSB nélkül az Rbx nem befolyásolta az EC bazális eNOS foszforilációját sem a Thr(495) sem a Ser(1177) pozícióban. Az Rbx növelte a Ser(1177) foszforilációját 50%-os CSB jelenlétében (p < 0,05 vs. CSB, 5.9.3.3.6.1. ábra A panel), miközben csökkentette azt a Thr(495) pozícióban (p < 0,05 vs. CSB, 5.9.3.3.6.1. ábra B panel). A Rbx növelte a foszfo Ser(1177)-eNOS/foszfo-Thr(495)-eNOS hányadost a 20%-os (p < 0,05) és az 50%-os (p < 0,001) koncentráció mellett (5.9.3.3.6.1. ábra C panel).







dc_360_141



5.9.3.3.6.1. ábra A PKCß specifikus gátlójának, a ruboxistaurinnak (Rbx) a hatása a CSB által kiváltott eNOS-foszforilációs változásokra. A foszfo-Ser(1177)-eNOS (), és a foszfo-Thr(495)-eNOS () és a total eNOS fehérje intenzitásokat mutatjuk 10-20-50%-os CSB és Rbx (30 nM) jelenlétében. A Rbx növelte a CSB kiváltotta Ser(1177) foszforilációt az 50%-os CSB koncentráció esetében (*:p < 0.05 vs. CSB), viszont csökkentette a CSB indukálta Thr(495) foszforilációt minden CSB koncentrációban (10-20-50%) (*:p < 0.05 vs. CSB). A Rbx növelte a fo szfo-Ser(1177)-eNOS/foszfo-Thr(495)-eNOS hányadost a 20% és az 50% CSB koncentráció mellett

 $(^{\dagger}:p < 0.05 \text{ and }^{\dagger\dagger}:p < 0.001 \text{ P-Ser(1177) vs. P-Thr(495)}, (n = 6). Az ábra felső részén reprezentatív Western blot képet mutatunk a foszfo-Ser(1177)-eNOS-ról, a foszfo-Thr(495)-eNOS-ról és a teljes eNOS fehérje intenzitásáról.$

5.9.4. Dohányzás okozta renális artéria relaxáció és hiperfiltráció (XVI, XVII)

5.9.4.1. Bevezetés

Nagy epidemiológiai keresztmetszeti tanulmányok (IRSA, PREVEND, 283-285) szerint a válogatás nélküli populációban a dohányosok glomeruláris filtrációs rátája (GFR) magasabb, mint a nem dohányosok esetében. Egészséges egyénekben egyetlen cigaretta elszívása is már átmeneti vérnyomás-emelkedéshez vezet (286). Annak lehetősége is felmerült, hogy dohányzás alatt az akut vérnyomás-emelkedésből és a veseerek autoregulációs változásaiból adódóan nő a glomeruláris nyomás (287).

Ebben a tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy egy cigaretta elszívása milyen akut hemodinamikai és renális vazomotor változásokkal jár, és hogy azok hátterében lehet-e oxidatív stressz. Mindezek miatt először in vivo, egészséges egyénekben Doppler ultrahangos módszerrel detektáltuk a veseerek rezisztencia indexének akut változását dohányzás közben, majd patkányból izoláltunk első oszlásbeli arteria renalis ereket és ezeken tanulmányoztuk myograph segitségével a vízoldékony dohányfüst puffer (wCS) hatását.

5.9.4.2. Módszerek

5.9.4.2.1. Humán tanulmány

Nyolc egészséges dohányos férfit (kor: 21-41 év) vizsgáltunk. Az önkéntesek naponta 17,7±6,9 cigarettát szívtak és átlagosan 13,3±5,0 éve dohányoztak. Vesebetegség az esetükben az anamnézis, a fizikális, a laboratóriumi (szérumkreatinin: 91±9 µmol/l, eGFR (Mayo): 120±12 ml/min/1,73 m², mikroalbuminuria: 9±7 mg/l) és az ultrahangos vizsgálat alapján kizárható volt. Az önkéntesek 8 órával a vizsgálat előtt (egy éjszakán keresztül) nem dohányoztak. A vizsgálat előtt vízszintes pozícióban 15 percig nyugalomban voltak, majd egy szál cigarettát szívtak el (filteres Camel, kátrány: 10 mg/c, CO: 10 mg/c, nikotin: 0.8 mg/c) 5 perc alatt. A Doppler spektrumot jól képzett radiológus vette fel az arteria renalis első oszlásából származó érről. A rezisztencia indexet

RI= (csúcs szisztolés sebesség – vég diasztolés sebesség) / csúcs szisztolés sebesség mértük ugyanabban az érben 3 perccel a dohányzás megkezdése előtt, minden percben a dohányzás során, majd minden 3. percben utána. A nyolc önkéntes három egymást követő RI mérésének, a rágyújtás előtti periódusban mért variációs koefficiense 1.6±1.0% volt. A megadott időpontokban szisztémás vérnyomás- és szívfrekvencia-mérés is történt. Egy másik napon ugyanezeknél az önkénteseknél megegyező protokoll szerint nikotinos álcigarettázás, majd nikotinmentes cigarettaszívás is történt (HoneyRose De Luxe). Az RI, az artériás középnyomás (mean arterial pressure, MAP) és a szívfrekvencia értékeket a kiindulási, a dohányzás előtti érték százalékában fejeztük ki. A tanulmányt a Regionális Etikai Bizottság engedélyével végeztük.

5.9.4.2.2. Állatkísérletek

A wCS-t az előzőekben leírtaknak megfelelően készítettük. Hím Sprague-Dawley patkányokon végeztük a kísérleteket (10-12 heteseket, 300-350 g-osakat, összességében 86 egyedet). A kísérlet napján az állatokat mély anaesthesiában dekapitáltuk. Az arteri renalis első oszlási ágaiból 2 mm hosszú szegmentumokat izoláltunk (~150-200 µm-es átmérőjűeket), amelyeket jéghideg Krebs pufferben tartottunk a felhasználásig. Rozsdamentes acél dróthurokra (40 µm átmérőjűre) fűztük az érszegmentumokat és egy négycsatornás Danish Multimyograph (Model 610M) segítségével végeztük a méréseket. Az ereket Krebs pufferben tartottuk, amelyet 5%-os CO₂-vel és 95%-os O₂-vel buborékoltattunk át, 37°C-on, pH 7.4 mellett. A nyugalmi feszülés/belső kerület arányt egyenként határoztuk meg, A belső kerületet 0.9 x L₁₀₀-re állítottuk, ahol L₁₀₀ az ér belső kerület lenne akkor, ha *in vivo* a transmurális nyomás 100 Hgmm lenne. Ez után a normalizálás után az érszegmentumokat 30 percig pihentettük és az izometriás feszülést regisztráltuk. Az ér kontraktilitási képességét izotóniás 60 mM-os KCl oldattal mértük, ami a Krebs puffer NaCl tartalmát helyettesítette. Azokat az ereket, amelyek erre a hatásra kisebb választ adtak, mint 10 mN nem használtuk fel. Az intakt ér-endotélium jelenlétéről acetilkolin-teszttel győződtünk meg, ha az acetilkolin (ACh) 3x10⁻⁶ M-os koncentrációja a</sup>
KCl-os prekontrakció kisebb, mint 50%-os relaxációját okozta, szintén nem került felhasználásra. Az érpreparátumot háromszor mostuk Krebs pufferrel, majd pihentettük 20 percig. Amennyiben a kísérlet megkövetelte az endotélium elroncsolását, az érpreparátum lumenén óvatosan egy hajszálat húztunk át, majd mostuk. Mivel a kísérletek során relaxációra és kontrakcióra is lehetett számítani, ezért 100 nM epinefrint használtunk a prekontrakcióhoz, amely a KCl-os összehúzáshoz képest 60%-os kontrakciót okozott. Amikor ezzel stabil kontrakciós platót kaptunk, növekvő dózisú (1%, 5%, vagy 10% végkoncentrációjú) cigaretta dohányfüst pufferrel (wCS) kezeltük az eret. Mivel az epinefrin kiváltotta izometriás kontrakció az idővel csökkent, az eredményeket erre a csökkenésre normalizáltuk. A wCS relaxációt okozott, amit a kontroll százalékában fejeztünk ki.

A szolubilis guanilát cikláz (az NO által aktivált forma) gátlójaként oxadiazolo-quinoxalin-1et (ODQ, 5 μ M), az ATP-szenzitív kálium csatorna (K_{ATP}) gátlójaként glibenklamidot (10 μ M), a nagy konduktanciájú kálcium aktiválta kálium csatorna gátlójaként tetretilammoniumot (TEA, 2 mM) alkalmaztunk 30 perces előinkubálásban. Szabadgyök-elfogóként glutationt (GSH, 4 mM), katalázt (1000 U/ml) vagy szuperoxid dizmutázt (SOD, 200 U/ml) adtunk az eret tartalmazó kamrához.

Másik kísérletsorozatban a Krebs puffer CaCl₂ tartalmát kicseréltük BaCl₂–ra (3,2 mM) és így nyertünk kontroll kontrakciót, majd a kísérletet megismételtük 5%-os wCS vagy L-típusú kálciumcsatorna-blokkoló nifedipine (10 nM) jelenlétében. A BaCl₂-os kontrakciós csúcshoz viszonyítottuk a wCS és a nifedipin hatását wCS/kontroll és nifedipin/kontroll hányados formájában. Az eredményket tovább korrigáltuk két következő nem kezelt BaCl₂-os kontrakcióra.

Harmadik kísérletsorozatunkban a Krebs puffer NaCl-ját ekvimoláris LiCl-dal cseréltük ki annak érdekében, hogy aktiváljuk a Na⁺-Ca²⁺ cserét. A kísérleti protokoll megegyezett a másodiknál leírtakkal. A lítium kiváltotta kontrakciókat 1%-os wCS-sel, vagy a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszport specifikus gátlójával, SEA0400-val (2 μ M) befolyásoltuk.

Az anyagokat a Sigma Chemicals-tól (St Louis, MO, USA) kaptuk, az SEA0400 kivételével, amit a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerészeti Kémiai intézetében állítottak elő.

Az állatkísérleteket etikai engedély alapján végeztük.

5.9.4.2.3. Statisztikai értékelés

Az adatok eloszlása normális volt, ezért az átlag \pm SD-t adtuk meg és a Student's *t*-tesztet alkalmaztuk mind a humán vizsgálatok, mind az állatkísérletek során. Az SPSS 15.0-ás verzióját használtuk (SPSS, Chicago, IL, USA).

5.9.4.3. Eredmények 5.9.4.3.1. Humán vizsgálatok

Egy egészséges fiatal férfi arteria renalis segmentális artériájának rezisztencia index (RI) változását mutatjuk (5.9.4.3.1.1. ábra) nikotinos cigaretta elszívása előtt, alatt és után. A dohányzás átmeneti RI-csökkenést okozott.







Az önkéntesek adatainak összesítését láthatjuk a következő ábrán (5.9.4.3.1.2. ábra), amelynek alapján igazolódott, hogy a cigarettaszívás akut RI csökkenéshez (P<0,05, <u>a</u> panel), átmeneti MAPemelkedéshez (P<0,05, 5.9.4.3.1.2. ábra <u>b</u> panel) és a szívfrekvencia (HR) emelkedéséhez vezet (P<0,05, 5.9.4.3.1.2. ábra <u>c</u> panel). A nikotinmentes cigaretta nem befolyásolta a MAP és a HR értékét, de hasonló RI-csökkenéshez vezetett (P<0,05, 5.9.4.3.1.2. ábra <u>a</u> panel), mint a nikotinos cigaretta. Az áldohányzás nem befolyásolta ezeket a paramétereket (5.9.4.3.1.2. ábra <u>a, b</u> és <u>c</u> panel).



5.9.4.3.1.2. ábra A cigaretta füst akutan csökkenti az arteria renalis első elágazásának rezisztencia indexét (RI, <u>a</u> panel), növeli az artériás középnyomást (MAP, <u>b</u> panel) és a szívfrekvenciát (HR, <u>c</u> panel) (n=8). A kezelés előtti értékeket 100%-nak vettük *=szignifikáns változás, P<0,05.

5.9.4.3.2. Állatkísérletek

Patkány arteria renalis első oszlási ágán végzett vizsgálataink kontrollját mutatja a bal panel (5.9.4.3.2.1. ábra), amelyen jól látható a platófázis kialakulása. A jobb oldali panel a wCS növekvő koncentrációinak relaxáló hatását mutatja.

dc_360_141



5.9.4.3.2.1. ábra Eredeti regisztrátumon demonstráljuk az epinefrin kontrakciót kiváltó hatását, a platófázis kialakulását (bal panel), és a dohányfüst vízoldékony extraktumának (wCS) vazodilatációs hatását (jobb panel).

Mint az az 5.9.4.3.2.2. ábra <u>a</u> panelén is látható a dohányfüst vízoldékony extraktuma hasonló relaxációs hatást fejtett ki nikotinos és nikotinmentes cigaretta esetében is. A nikotinos cigaretta dohányának vízoldékony kivonata (azaz a cigarettapapír nélkül) hasonló relaxációt váltott ki, mint az intakt cigaretta (5.9.4.3.2.2. ábra <u>b</u> panel). A cigarettapapír füstjének vizes extraktuma viszont szignifikánsan kisebb relaxációt okozott, mint az intakt cigaretta (5.9.4.3.2.2. ábra <u>b</u> panel).



5.9.4.3.2.2. ábra A nikotinos és a nikotinmentes cigaretta a patkány arteria renalis hasonló relaxációját eredményezi. (a) Az arteria renalis relaxációja különböző higítású dohányfüstre (wCS) nikotinos és nikotinmentes cigaretta esetén (n=6). (b) Az arteria renalis relaxációja nikotinos cigarettapapírmentes dohányfüstpuffer, vagy dohánymentes cigarettapapír füstpuffer hatására (n=6). NS, nem szignifikáns; *szignifikáns különbség, P<0,05.

A nikotinos wCS okozta relaxáció megmaradt akkor is, ha az endotéliumot eltávolítottuk, tehát nem endotélfüggő volt (5.9.4.3.2.3. ábra <u>a</u> panel). A nikotinos wCS kiváltotta relaxációt nem befolyásolta az oxadiazolo-quinoxalin-1 (5.9.4.3.2.3. ábra <u>a</u> panel), a tetraetilammónium (5.9.4.3.2.3. ábra <u>a</u> panel), vagy a glibenclamid (5.9.4.3.2.3. ábra <u>a</u> panel). Ezzel szemben a hidrogén-peroxidot bontó kataláz szignifikánsan csökkentette azt (5.9.4.3.2.3. ábra <u>b</u> panel), és a szuperoxid dizmutáz (SOD) pedig szignifikánsan növelte a relaxációt (5.9.4.1.3.2.3. ábra <u>b</u> panel). A glutation peroxidáz

enzim aktivitásához szükséges redukált glutation (GSH) szintén csökkentette a nikotinos wCS által kiváltott relaxációt (5.9.4.3.2.3. ábra \underline{b} panel).



5.9.4.3.2.3. ábra Az endotélium-eltávolítás, a szabad gyökök és az ioncsatornák befolyásolásának hatása a nikotinos wCS által kiváltott relaxációra. (a) Az ér relaxációja wCS hatására intakt (n=6) és eltávolított endotélium esetén (n=6) és az oxadiazolo-quinoxalin-1 (n=3), a tetraetilammónium (n=3) vagy a glibenclamide (n=4) hatása. (b) A hidrogén-peroxidot bontó kataláz (n=4), a redukált glutation (n=6) vagy a szuperoxid dizmutáz (n=6) hatása a nikotinos wCS által kiváltott relaxációra. Rövidítések: ODQ, oxadiazolo-quinoxalin-1; TEA, tetraetilammónium; GSH, redukált glutation; SOD, szuperoxid dizmutáz; NS = nem szignifikáns; *szignifikáns különbség, P < 0.05.

Depolarizáló, BaCl₂ tartalmú Krebs oldatban átmeneti kontrakciót figyeltünk meg, amit az 5%-os nikotinos wCS csökkentett. Figyelemreméltó, hogy a relaxáció nem különbözött az L-típusú kálcium-csatorna-blokkoló nifedipin hatásától (5.9.4.3.2.4. ábra <u>a</u> panel). A Na⁺-Ca²⁺ cseretranszportot aktiváló, lítium tartalmú Krebs oldat átmeneti kontrakciót váltott ki. A Na⁺-Ca²⁺ cseretranszportert gátló SEA0400 csökkentette ezt a kontrakciót, hasonlóan, mint az 1%-os wCS (5.9.4.3.2.4. ábra <u>b</u> panel).



5.9.4.3.2.4. ábra A cigaretta füst csökkenti az artéria renalis kontrakcióját, hasonlóan a nifedipinhez és a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporter gátlójához. (a) A nikotinos dohányfüstpuffer (wCS, n=6) és a nifedipin (n=6) hatása a depolarizáló (BaCl₂ tartalmú) inkubáló oldat által kiváltott arteria renalis kontrakcióra. (b) A nikotinos dohányfüstpuffer (wCS, n=3) és a SEA0400 (n=6) hatása a LiCl által kiváltott arteria renalis kontrakcióra. Rövidítések: SEA0400, a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporter gátlója; LiCl, litium klorid; BaCl₂, bárium klorid; NS, nem szignifikáns.

5.9.5. Lehetséges összefüggés a dohányzás és a Kimmelstiel-Wilson lézio között (**XVII, XVIII**) 5.9.5.1. Bevezetés

A közelmúltban jelent meg a nemzetközi konszenzusos állásfoglalás a diabeteses nephropathia szövettanáról. Ebben a Kimmelstiel-Wilson-lézió (KW), vagy másnéven a noduláris glomerulosclerosis külön entitásként, class III megjelöléssel szerepel (288). Érdekes irodalmi adat szerint Kimmelstiel-Wilson szerű léziók (noduláris glomerulosclerosis, glomerulomegalia, a glomeruláris bazális membrán megvastagodása és arteriola hyalinosis) nem cukorbetegekben is előfordulnak (289,290), és ezeket nem diabeteses noduláris glomerulosclerosisnak nevezik. Az esetek egy részében semmilyen egyéb vesebetegség sem mutatható ki, ekkor "idiopathiás noduláris glomerulosclerosis" a diagnózis. Ez a betegség ritkán fordul elő és az irodalmi adatok hypertoniához és dohányzáshoz kötik, olyannyira, hogy egyesek "smoking-associated nodular glomerulosclerosis"-t emlegetnek (291), amely sokkal gyakoribb férfiakban, mint nőkben (292).

Figyelembe véve azt a tényt, hogy az idiopátiás noduláris glomerulosclerosist túlnyomórészt férfiakban diagnosztizálják, valamint azt is, hogy Magyarországon több férfi dohányzik, mint nő (férfi dohányosok prevalenciája 38,3%, a nőké 23%, 293), úgy döntöttünk, hogy az összehasonlítható csoportok felállítása érdekében ebbe a tanulmányunkba, csak férfiakat vontunk be. Az volt a célkitűzésünk, hogy vesebiopsziás adatbankunkból (n=644 férfi) származó adatok alapján összehasonlítsuk a következő három csoportot: 1. 2-es típusú cukorbeteg férfiak a KW hisztológiai diagnózisával (KW csoport), 2. 2-es típusú cukorbeteg férfiak a diabeteses nephropathia hisztológiai diagnózisával, de KW nélkül (class 1,2, vagy 4, non-KW csoport), 3. nem diabeteses noduláris glomerulosclerosisban szenvedő férfiak (non-diab NGS csoport, ebbe a csoportba beletartoztak az idiopathias noduláris glomerulosclerosisos és az ismert okú, de nem diabeteses betegek is).

5.9.5.2. Módszerek

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi kar II. sz Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum Veseszövettani Laboratóriumában rendelkezésre álló, 2001 és 2011 között készült 644 férfi beteg szövettanát dolgoztuk fel. Ugyanaz a nephropathologia területén nagy jártassággal rendelkező szövettanász vizsgálta az összes szövettani mintát, aki nem ismerte a betegek dohányzási anamnézisét. A 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő, Kimmelstiel-Wilson-léziókat mutatók, vagy anélküli diabeteses nephropathiások, illetve a nem diabeteses noduláris glomerulosclerosis diagnózissal rendelkezők retrospektív analízise történt meg. Klinikánkon minden vesebiopsziás minta azonnal ellenőrzésre és feldolgozásra kerül, csak azokat a bioptátumokat tartjuk elfogadhatónak, amelyekben legalább 15±8 glomerulus van. Minden mintából immunfluoreszcencia, fénymikroszkópia és elektronmikroszkópia is történik, ahogy az az ajánlásokban szerepel (294). A 2-es típusú cukorbetegség és a KW lézió diagnózisa az ajánlásoknak megfelelően történt (ez utóbbiról akkor beszélünk, ha legalább egy glomerulusban noduláris glomerulosclerosist találunk és a

glomerulusok kevesebb, mint 50%-ában mutatható ki globális glomerulosclerosis (295,296), valamint volt krónikus membranoproliferatív glomerulonephritis, kizárható krónikus thromboticus microangiopathia, amyloidosis, monoclonális immunglobulin lerakódással járó betegség, fibrilláris glomerulonephritis és immuntaktoid glomerulopathia. A non-KW csoportba akkor kerültek a betegek, ha 2-es típusú cukorbetegség volt igazolható és KW léziót nem találtunk. A non-diab NGS csoportba azok a férfi betegek kerültek akiknél noduláris glomerulosclerosis volt kimutatható, de a cukorbetegséget ki lehetett zárni orális glukóztolerancia teszttel, vagy éhomi plazmaglukóz-, vagy hemoglobin A1c méréssel. Ezeknek a betegeknek megvizsgáltuk a vesebiopszia utáni időszakát is, és így meg tudtuk állapítani, hogy 2-9 évvel a diagnózis után sem alakult ki náluk cukorbetegség. A szövettani leírás tanulmányozásán kívül a diabeteses nephropathia progresszióját okozó tényezők számbavétele is megtörtént a vesebiopszia időpontjában (kor, testtömegindex (BMI), a cukorbetegség tartama, hypertonia jelenléte (vérnyomás > 140/90 Hgmm), a hypertonia tartama, renin-angiotenzinaldoszteron-rendszert gátlók szedése (ACEI, ARB, vagy mineralocorticoid-receptor-blokkoló) szérum koleszterin, triglicerid, HbA1c, becsült GFR (MDRD-175 formula). Az egészségügyi dokumentáció tanulmányozása alapján állapítottuk meg a dohányzási szokásokat. Mindegyik csoportot két alcsoportra osztottuk: valaha is dohányzó és soha nem dohányzóra. A cigaretta-fogyasztást a szokásos módon csomag-évben adtuk meg (1 csomag-év = napi 20 cigaretta elszívása egy éven keresztül).

Az ANOVA-t, a chi-négyzet próbát és a Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk, a kérdésfelvetésnek és az adatok eloszlásának megfelelően. Az adatok átlag \pm SD értékét adtuk meg. Az adatok eloszlása normális volt a szérumösszkoleszterint, a -trigliceridet, az eGFR-t, és a csomagévet kivéve. Az SPSS 17.0-es számú verzióját használtuk (SPSS, Chicago, IL, USA), és a P < 0,05 esetén állapítottunk meg szignifikanciát.

5.9.5.3. Eredmények

A klinikánkon 2001 és 2011 között a férfiak körében elvégzett vesebiopszák (n=644) 9,5%ában (n=61) igazolódott diabeteses nephropathia, közülük 15 esetben lehetett felállítani a KW diagnózisát (2,3%) és 46 esetben diagnosztizáltunk nem KW diabeteses nephropathiát (7,2%, non-KW). Nem diabeteses noduláris glomerulosclerosist 1,1%-ban találtunk (n=7), akik közül 2 betegnek (0,3%) idiopathiás noduláris glomerulosclerosisa és 5-nek (0,8%) nem diabeteses, de ismert eredetű noduláris glomerulosclerosisa volt (5.9.5.3.1. ábra).





5.9.5.3.1. ábra A diagnózisok megoszlása a 644 férfi beteg vesebiopsziás mintáiban 2001 és 2011 között. Rövidítések: diab NP = diabeteses nephropathia 2-es típusú cukorbeteg férfiakban, non-diab NGS = nem diabeteses noduláris glomerulosclerosis, KW = Kimmelstiel-Wilson-lézió; non-KW = nem KW léziós diabeteses nephropathia, idnod = idiopathiás noduláris glomerulosclerosis, MIDD = monoclonális immunglobulin-depozíciós betegeség, amyl = amyloidosis, imt GP, immuntaktoid glomerulopathia, mem GN = membranoproliferativ glomerulonephritis.

A vesebiopszia indikációja mindhárom csoportban (KW, non-KW, non-diab NGS) a következők voltak: nephrosis, nephrosonephritis, proteinuria, haematuria, azotaemia.

Az egyes csoportok számos klinikai paraméter szempontjából nem különböztek egymástól (5.9.5.3.1. és 5.9.5.3.2. táblázat).

5.9.5.3.1.	táblázat	Α	Kimmelstiel-Wilson-léziós	diabeteses	nephropathiás	(KW),	a	nem
Kimmelst	iel-Wilson	-léz	iós diabeteses nephropathia	s (non-KW) és a nem dial	oeteses n	odu	láris
glomerulo	oszklerozis	zos	(non-diab NGS) csoportok k	linikai jellei	nzőinek összhas	onlítása.		

	KW (n=15)	non-KW (n= 46)	non-diab NGS (n=7)	Р
Kor (év)	56 ± 1	56 ± 9	55 ± 1	0,935
BMI (kg/m ²)	30 ± 5	31 ± 5	28 ± 6	0,538
HTNprev (%)	93	87	86	0,782
HTNdur (év)	11 ± 8	13 ± 10	11 ± 6	0,948
Chol (mmol/l)	5,2 (4,0-6,3)	5,5 (4,3-7,2)	5,7 (4,7-9,9)	0,500
Tri (mmol/l)	2,0 (1,4-2,7)	2,4 (1,6-3,1)	3,4 (1,1-3,6)	0,784
eGFR (ml/min)	25 (13-47)	42 (20-70)	42 (23-77)	0,483
Proteinuria(g/nap)	$3,7 \pm 1,7$	$2,3 \pm 1,6$	$5,8 \pm 4,2$	*
RAS-gátló (%)	100	87	100	0,222

Rövidítés: KW = Kimmelstiel-Wilson-léziós, non-KW = nem Kimmelstiel-Wilson-léziós diabeteses nephropathia, non-diab NGS = nem diabetese noduláris glomeruloszklerozisz, HTNprev = a hypertonia prevalenciája, HTNdur = a hypertonia tartama, Chol = szérumkoleszterin, Tri = szérumtriglicerid, eGFR = becsült glomerulus filtrációs ráta (MDRD-175 formulával), RAS-blocker = renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszert gátló kezelés. * Az értékek logaritmusát alapul véve, Bonferroni post hoc teszttel: KW vs. non-KW, P = 0,153; non-KW vs. non-diab NGS, P = 0,042; KW vs. non-diab NGS P = 1,0.

5.9.5.3.2.	táblázat A	A Kimmelstie	el-Wilson lesi	ós (KW)	és a nem	Kimmelstiel-Wilson	lesiós	(non-
KW) dia	beteses ne	phropathiás b	oetegek klinik	ai jellen	nzői			

	KW (n=15)	non-KW (n=46)	Р
DMtart. (év)	11 ± 6	10 ± 7	0.617
HbA_{1c} (%)	$6,5 \pm 1,0$	$6,0 \pm 1,0$	0,880

Rövidítések: DMtart = a diabetes mellitus tartama; HbA_{1c} = haemoglobin A_{1c}

Szembetűnő különbséget észleltünk azonban a dohányzás szempontjából. Míg a KW csoport tagjainak nagy többsége (13/15= 87%) dohányzott, addig a non-KW csoportban ez az arány lényegesen alacsonyabb volt (16/46= 35%, p=0,001 vs. KW). Ugyanakkor a non-diab NGS csoport minden tagja (7/7= 100%; p=1,0 vs. KW, 5.9.5.3.2. ábra) dohányos volt. Amennyiben a cigarettafogyasztást csomagévben fejezzük ki, a csoportok közötti különbségek szintén kifejezettek (KW: 15(6-30); non-KW: 0(0-21); non-diab NGS: 30(16-33); p=0,010 non-KW vs. KW; p=0,008 non-KW vs. non-diab NGS; p=0.185 KW vs. non-diab NGS) az adatok mediánját és minimum maximum értékét adtuk meg).



5.9.5.3.2. ábra A dohányosok előfordulása az egyes csoportokon belül. Rövidítések: KW = Kimmelstiel-Wilson-léziós, non-KW = nem Kimmelstiel-Wilson-léziós diabeteses nephropathia, nondiab NGS = nem diabeteses noduláris glomeruloszklerozisz. Chi-négyzet teszt (KW vs. non-KW), P=0,001.

5.10. Megbeszélés

5.10.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitusban (DM) a szérum glikoxidációs paraméterei – a karboximetil-lizin (CML) és a glikációs végtermék-fluoreszcencia (AGE-FL) – nem volt magasabb a normális vesefunkciójú betegekben, mint az egészséges kontrollokban. Ez az eredmény megegyezik mások adataival, amelyek szerint diabeteses normális vesefunkciójú betegek szérumában normális AGE-FL-t (297), CML-szintet (298), ELISA (299) és pentozidin értéket (HPLC, 300) mértek. Mások, viszont magasabb CML-szintet (301) és magasabb nem-specifikus AGE-koncentrációt (302) találtak diabeteses betegekben. Ezt az ellentmondást talán magyarázhatja a később említett két tanulmány betegeiben mért magasabb hemoglobin A_{1c} érték. Tanulmányunkban, a kevésbé súlyos diabeteses anyagcserezavar magyarázhatja azt, hogy nem korrelált a CML és a hemoglobin A_{1c} . Szignifikáns korrelációt – az irodalom szerint - csak a rossz anyagcseréjű cukorbetegekben lehetett találni a hemoglobin A_{1c} és a hemoglobin-AGE között (303).

Vizsgálatunkban a csökkent vesefunkciójú diabeteses csoportban a CML és az AGE-FL megemelkedett. Ugyanebben a csoportban a szérum AGE-paraméterek korreláltak a vesefunkcióval. Ezek az eredmények hasonlóak az irodalom számos adatához, amelyek szerint az emelkedett nem-specifikus AGE (302, 304) és előrehaladott oxidációs végtermékek szintje (305), a glikoxidációs

pentozidin (306) és a szérumkreatinin szint között korreláció áll fenn a csökkent vesefunkciójú diabeteses betegekben. A vesefunkció csökkenésével, a vese jelentősége minden egyéb tényező elé kerül a szérum AGE-szint kialakítása szempontjából. Ezt támasztja alá az extrém mértékben megemelkedett szérum-CML-szint jelenléte is végállapotú veseelégtelenségben (3-4-szer magasabb szérum szintek, mint egészségesekben (307,308). Az extrém magas szérum AGE-szint oka a vesében történő csökkent degradáció és kiválasztás lehet. Mivel a vizelet-CML-ürítés elsősorban alacsony molekulasúlyú formában történik, veseelégtelenségben megemelkedik a szérum alacsony-molekulasúlyú CML-szint, mint azt saját eredményeink is igazolták.

Vizsgálatunkban, egészséges egyénekben $1,76 \pm 0,62$ mg/nap azaz $0,9 \pm 0,4$ µg/mg kreatinin volt a vizelet CML kiválasztás, ami jó megegyezést mutat az irodalomban fellelhető, GC-MS-sel mért $1,0 \pm 0,3$ µg/mg kreatinin értékkel (309).

Felmerülnek az anyagcsereromláson kívül egyéb lehetőségek is a 2-es típusú diabeteses betegek proteinuria-progressziójának felgyorsulása esetén, így pl. egyidejű glomerulonephritis vagy pyelonephritis jelenléte (310). Ezek kizárása, illetve diagnosztizálásuk esetén specifikus kezelésük szükséges.

Összefoglalva diabeteses betegeink vizsgálatával nyert eredményeinket, 2-es típusú, elfogadható szénhidrát háztartású diabeteses betegeink szérum glikoxidációs AGE-termékeinek szintjét elsősorban a vesefunkció határozza meg. Az ischaemiás szívbeteg 2-es típusú cukorbetegek GFR-je alacsonyabb, szérum AGE-szintje és albuminürítése magasabb. Ezek az adatok harmonizálnak az IgANP-s betegek esetében találtakkal. Sőt előrevetítik a dializált betegeinkben kimutatott eredményt, amely szerint az AGE-szintje befolyásolja a mortalitást.

5.10. Megbeszélés

5.10.2. A nem enzimatikus glikáció megfordíthatósága

Megfigyelték, hogy az FN3K enzim ubikviter módon fejeződik ki, génje a klasszikus "housekeeping" génekéhez hasonló, azonban olyan szövetekben, amelyekben a diabeteses szövődmények gyakoriak, például a vesében, szívben, idegrendszerben, kifejeződése jelentősen megnövekszik. Külső stimuláló hatásokra azonban (pl: hyperglykaemia, inzulinhatás, IL-1β) átíródása nem változik. A lizinben gazdag intracelluláris fehérjéket (pl: hisztonok, krisztallinok, kollagén) védi, valószínűleg a sejttúlélésben is szerepet játszik (198). Az FN3K génjében több SNP összefüggést mutat az enzim aktivitásával. Az általunk is vizsgált G900C variáns esetében a báziscsere nem okoz a kódolt fehérje aminosav-szekvenciájában változást, továbbá a "splicing"-ot sem befolyásolja, így valószínű, hogy az enzimaktivitás változásáért nem a SNP önmagában, hanem feltételezhetően más "enhancer" elemek polimorfízmusával való "linkage" a felelős. Ezeket az összefüggéseket jelen tanulmányunkban nem vizsgáltuk.

Az FN3K enzim intracelluláris aktivitással rendelkezik, az extracelluláris glikációra nincs hatással. Ismert továbbá az is, hogy a vörösvértestekben nagymértékben kifejeződik. Állatkísérletek szerint, az FN3K -/- egerekben a szérumfruktózamin-szintekben nincs különbség az FN3K+/+ egerekhez képest. Ezt a megfigyelést saját in vivo eredményeink is alátámasztják, hiszen a fruktózamin szérumszintjében nem találtunk különbséget.

A HbA_{1c} klinikailag kiemelkedően fontos jelentőségű glikoprotein, hiszen a betegek átlagos glikémiás állapotát három hónapra visszamenőleg jelzi, ezáltal lényeges információt nyújt a terápia hatékonyságáról. Számos közleményben felvetették annak lehetőségét, hogy az FN3K enzim aktivitása összefüggést mutat az össz-glikált hemoglobin mennyiségével, és a HbA_{1c}-vel. Delpierre és mtsai. azonban arról számoltak be, hogy szignifikáns és inverz a korreláció az enzimaktivitás és az össz-glikált hemoglobin mennyiség között (195). Továbbá azt is leírták, hogy meglepő módon, 8% feletti HbA_{1c} esetén figyelhető meg a vörösvérsejtekben a foszforilált fruktózlizin szintjének emelkedése. Erre tényleges magyarázat jelenleg még nem áll rendelkezésre. Lehetséges, hogy az FN3K-n kívül létezik más deglikációs rendszer is a sejtekben, amely túl magas és tartós hyperglykaemia esetén már kimerül (198).

Az irodalomban többször volt arról szó, hogy a hemoglobin ß láncának N-terminális glikált valinja gyenge szubsztrátja az FN3K enzimnek. Ezt in vitro kísérletek alapján igazolták, azonban nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az FN3K in vivo betöltött szerepéről. Az intracelluláris deglikációs hipotézis szerint az FN3K enzim által katalizált reakciónak hatása lehet a klinikailag kiemelt fontosságú HbA_{1c} szintjének változásában. Sőt, genetikai variánsai, eltérő módon befolyásolhatják annak értékét. Ikrekben történt vizsgálat is megmutatta, hogy a HbA_{1c}-szintje genetikailag determinált (311).

Több tanulmány felvetette az összefüggést az FN3K enzim génpolimorfizmusai és a diabeteses mikrovaszkuláris szövődmények között. Tanulmányunkban mi is vizsgáltuk ezt és logisztikus regressziós vizsgálatunk azt igazolta, hogy a G900C SNP és a szövődmények jelenléte között nincs összefüggés, tehát a polimorfizmus patogenetikai szerepét nem tudtuk igazolni.

Összefoglalva eredményeinket arra a következtetésre jutottunk, hogy az FN3K enzim G900C polimorfizmus CC variánsa pozitív módon függ össze a szénhidrát-anyagcserével, továbbá a CC variáns esetében a diabétesz idősebb életkorban kezdődik. A mikrovaszkuláris szövődmények kialakulásával azonban nem mutatott összefüggést. A G900C polimorfizmus T2DM-re gyakorolt hatásának tisztázásához azonban további genetikai és klinikai vizsgálatok szükségesek. A deglikáció hatékonyságának változatlan volta ellenére a diabetes mellitussal, az IgANP-val és a dializált betegekkel foglalkozó fejezetben leírtakból fakadóan romló vesefunkció esetén emelkedő AGE-szinteket tapasztalunk. Így az FN3K polimorfizmusainak a glikációra kifejtett hatását a vesefunkció ismeretében kell értékelni.

5.10. Megbeszélés

5.10.3. A nem enzimatikus glikáció növeli vesében a reninpozitivitást

Az MG-vel kezelt patkányok veséiben az arteriolák fala kiszélesedett és ez az érelváltozás, az eosinophiliával, a homogén PAS pozitivitással, a változó lumenszűkülettel az emberi diabeteses microangiopátiára jellemző morfológiai képhez hasonló (205). Mivel ezt az érkárosodást mind az afferens, mind az efferens arteriolák falában láttuk, valószínűsíthető, hogy az MS szerves részeként létrejövő anyagcsere-károsodás okozta elváltozásról van szó, mert esszenciális hypertoniában csak az arteriola afferens mutat ilyen jellegű károsodást (205). A kiszélesedett érfalakban IH-val és EM-mel renin-akkumulációt igazoltunk. Ezen leletünk azért külön hangsúlyozandó, mert a fentiekkel megegyező IH képet írtak le streptozotocinnal előidézett kísérletes diabetes mellitusban is (312).

A glomerulusok vizsgálata során megfigyelt tág lumenű kapilláriskacsok és a mezangialis matrix felszaporodása ugyancsak megfelel emberi és kísérletes diabetes mellitus korai szakaszában látható veseelváltozásoknak (205).

A vesepapillák tubulointerstitiumában az MG-vel kezelt állatokban reninakkumulációt igazoltunk, ugyanitt fibrózis is kialakult. Humán diabetes mellitusban gyakori szövődmény a vesék tubulointerstitialis fibrózisa (313). Vizsgálataink alátámasztják azt a véleményt, amely szerint diabetes mellitusban a vesében reninakkumuláció történik, miközben a szisztémás keringésben gyakran észlelünk hyporeninaemiát (314). A renin-angiotenzin rendszer lokálisan nagyon aktív a vesében (315). Angiotenzin II infúziója patkányokban az interstitium lobsejtes infiltrációját hozza létre (316), s ismeretes, hogy az angiotenzin II glomeruláris és interstitiális fibrózist okozhat (317-320). Vese fibroblast sejttenyészetben az angiotenzin II fokozza a sejtproliferációt, valamint a fibronektin és a kollagén, továbbá a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) expresszióját (321). A TGF- β pedig a legerősebb pro-fibrotikus citokin (322).

Ezen irodalmi adatok és kísérleti eredményeink alapján az MG intracerebrális injektálásával létrehozott metabolikus syndromában a TI-ben akkumulálódó renin a vese papillafibrózis kialakulásának egyik oka lehet. Az AGE-termék imidazolon reabszorpciója tehát károsítja a vesét, ugyanakkor ez a vesekárosodás a filtráció csökkenése miatt tovább emeli az AGE-k szintjét, ami circulus vitiosushoz vezet, melynek kimenetele az atheroscleroticus eredetű cardiovascularis halálozás növekedése (lásd dializáltakról szóló eredményeinket és a megbeszélést).

5.10. Megbeszélés

5.10.4. Diabeteses nephropathia és O-glikoziláció

A rendelkezésre álló irodalom alapján állíthatjuk, hogy az emelkedett vércukorszint részben a fokozott hexózamin anyagcsereúton, valamint fokozott O-glikoziláción keresztül fejti ki káros hatását

(207,211, 221), habár a diabeteses nephropathia vonatkozásában a rendelkezésre álló információ kevés.

Ebben a tanulmányunkban elsőként írtuk le, hogy humán vesetubulusokban, a sejtmagban és a citoplazmában is megtalálható O-glikoziláció. Valamint megállapítottuk, hogy a tubularis epitheliális sejtek citoplazmájában az általunk használt antitest fokozott, granuláris jelet adott. Ennek magyarázata lehet, hogy a glukóz reabsorpciója a proximalis kanyarulatos csatornában történik. Rosszul beállított diabeteses egyének vizeletében emelkedik a glukóz koncentrációja, emiatt a proximális tubulushámsejtekben nő a felvett glukóz mennyisége, mely fokozza a HBP-t és növeli az O-glikozilációt. A fokozott O-glikoziláció hatásaként, mint már korábban említettük, létrejöhet egy blokád a sejtciklus G₁ fázisában, mely hypertrophiához vezet.

Különbséget mutattunk ki a glomeruláris podocyta és a vesetubulushámsejtek O-glikoziláció szintjében diabeteses és nem diabeteses egyének közt, mely, együtt a korábbi sejtkultúrán elvégzett tanulmányokkal felvetheti az O-glikoziláció kóroki szerepét diabeteses nephropathiában. Azonban tekintettel a kis esetszámra, valamint a használt módszerünk limitációira tanulmányunk egyértelmű következtetés levonására nem alkalmas, nagyobb esetszámú, részletes vizsgálat elvégzése szükséges ennek a hipotézisnek az igazolására. Ezek az eredményeink rávilágítanak arra a szoros kapcsolatra is, amely az oxidatív stressz, a nem enzimatikus glikáció és az enzimatikus glikoziláció között fennáll, és felhívják a figyelmet arra, hogy ezek egyidejűleg is jelentkezhetnek.

5.10. Megbeszélés

5.10.5. IgA nephropathia

IgANP-ás patkánymodellben emelkedett malondialdehid-plazma-szintet és vese-koncentrációt igazoltak, és azt találták, hogy az antioxidáns kezelés mérsékli a glomeruláris károsodást (323-325). IgANP-ás betegek véréből izolált perifériás polimorfonukleáris leukociták fokozott szabadgyök-termelést mutattak. Egyéb humán vizsgálatok eredményei is alátámasztják annak valószínűségét, hogy az IgANP-ban a fokozott oxidatív stressz és a csökkent antioxidáns kapacitás szerepet játszhat a károsodások kialakulásában (139). Vizsgálataink szerint az IgANP-ban észlelt fokozott oxidatív stressz és az AGE-paraméterek nem a betegek szénhidrát háztartásának állapotától, hanem sokkal inkább a vesefunkció helyzetétől függnek. Ezek az eredmények nagy hasonlóságot mutatnak az elfogadható szénhidrátháztartású cukorbetegeinknél tapasztaltakkal. Az IgANP progresszióját a renin-angiotenzin-rendszer az oxidatív stresszen keresztül is befolyásolhatja, ezért nem meglepő, hogy az IgANP betegek kezelésében olyan jelentős szerepet játszanak az ACE-gátlók és az angiotenzin-receptor-blokkolók (VI).

5.10. Megbeszélés

5.10.6. A vizeletalbumin oxidatív és karbonil stressz általi módosítása

A diabeteses betegekben a HPLC-vel mért albuminuria jelentőségét hangsúlyozó publikációk száma egyre növekszik, bár a módszer tulajdonságai és összefüggései a klinikai paraméterekkel kevésbé ismertek. Ezért mi egy olyan HPLC-rendszert állítottunk össze, mely alkalmas a vizeletalbumin glikoxidációjának mérésére. Így következtethetünk az albumin módosulásának mértékére, továbbá tanulmányozhattuk összefüggéseit a klinikai paraméterekkel. Tanulmányunk igazolta, hogy a normo- és mikroalbuminuriás diabeteses betegek vizeletalbumin glikoxidációja korrelál a szérumkreatinin és az eGFR értékekkel, így a vese állapotával áll összefüggésben, nem pedig a glikémiás értékekkel (plazma glükóz, fruktózamin, HbA_{1c}). Ezen felül a lineáris regressziós modellek alapján, a szérumkreatinin és az eGFR a vizeletalbumin glikoxidáció független prediktorainak bizonyultak. Ezek a vizsgálatok ismét aláhúzzák a már korábban többször is kiemelt tényt, hogy a glikoxidáció mértékét a vesefunkció döntően befolyásolja (lásd cukor- és IgANP-s betegeinken végzett előző vizsgálatainkat).

A módosított albuminformák (főképp a glikált formákat vizsgálták) vesén keresztüli kiválasztásáról egymásnak ellentmondó feltételezések találhatók az irodalomban. Egy korábbi tanulmány valószínűsítette, hogy a módosított (glikált) albuminformák kiválasztása nagyobb mértékű a nem-glikált albuminhoz képest a normo- és mikroalbuminuriás diabeteses betegek közt (326). Az is felmerült, hogy a glikált fehérjéknek preferenciális transzportjuk van a mezangium felé, így nagyobb mennyiségben vannak jelen a vizeleti térben (327-328). Mások a glikált albumin preferenciális transzportját nem tudták igazolni (329). Az általunk kifejlesztett HPLC-s eljárás felhasználásával azt találtuk, hogy nagyobb arányban vannak jelen a módosított albuminformák a mikroalbuminuriás diabeteses betegek vizeletében, mint a normoalbuminuriásokéban.

A diabeteses vesében a hyperglykaemia lokálisan oxidatív stresszt okoz, melynek következményeképpen fluoreszcens albumin módosulatok képződnek. Ez a folyamat gyors változásokat okozhat a vizelettérben lévő molekulákban, éppúgy, mint az ahogyan in-vitro kísérletünk során rövid ideig alkalmazott 1mM-os MGO-os kezelés a HSA esetében. Ez azt jelentené, hogy minél súlyosabban csökken a vesefunkció és emiatt egyre nő az oxidatív stressz a vesében, annál több módosulás történik a vesében található molekulákon. E feltételezés igazolására további vizsgálatok elvégzése szükséges.

A HPLC-vel mért vizeletalbumin-koncentrációja szignifikánsan csökken hosszú távú fagyasztás után (330). Az irodalmi adatoknak megfelelően mi is szignifikáns vizeletalbumin-koncentráció-csökkenést tapasztaltunk. Ezen felül kimutattuk, hogy az in vitro preparált albumin koncentrációját nem befolyásolja a hosszú távú fagyasztás. Továbbá az is megállapítható, hogy a vizeletalbumin fluoreszcenciája kevésbé és fordított arányban változik az UV jelhez képest fagyasztás során, melynek oka valószínűleg a fagyasztás alatt is jelen lévő oxidatív stressz.

Vizsgálatunk egy lehetséges korlátja, hogy a HPLC mérés során az albuminnal interferálhatnak az albuminhoz hasonló méretű fehérjék, mint pl. az α_1 -savas glikoprotein vagy a transzferrin (331). Az albumin csúcs vizsgálata során ez a szennyeződés átlagosan csak 12,7% volt, mely nem több mint az irodalomban található érték, másfelől kicsi lehet a jelentősége annak tükrében, hogy 2-3-szoros a különbség a HPLC-vel és az IN-el mért eredmények között (332). Tanulmányunk másik korlátja, hogy eljárásunk csak a fluorofór AGE-k és oxidációs és lipoxidációs adduktumok nem specifikus fluoreszcenciáját méri, bár az egyes nem fluorofór anyagok koncentrációja a fluorofórokéval korrelál.

Összefoglalva egy olyan HPLC eljárást hoztunk létre, mely alkalmas a vizeletalbumin relatív glikoxidációjának meghatározására, mely az albumin glikoxidációjának mértékét jellemzi. Továbbá bemutattuk, hogy ez a módosulás diabeteses normo- és mikroalbuminuriás betegekben a vesefunkcióval függ össze, nem pedig a glikémiás paraméterekkel, amint azt számos más vizsgálatunk során is igazoltuk. In vitro vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az albumin módosítása eredendően nem okozza az immunoreaktivitás csökkenését, azonban további, in vivo vizsgálatok szükségesek e kérdés megválaszolásához.

5.10. Megbeszélés

5.10.6. Albumin vizeletürítésének HPLC-vel történő mérése. A tiol csoportok szerepe.

Magliano és munkatársai nemrégiben publikálták eredményeiket a HPLC-vel mérhető albuminuria mortalitás-prediktív értékéről. Vizsgálatuk során 7 évig -80 C-on tárolt vizeletminták albumin-koncentrációját mérték (333). Az eddig megjelent tanulmányok azonban máig nem fordítottak elég figyelmet a HPLC-s vizeletalbumin-mérések hosszú távú tárolás után végzett reprodukálhatóságát illetően. A vizelet fagyasztása során tapasztalható albumin-csökkenés nemcsak az idő, hanem a mérési módszer függvénye is. Vizsgálatukban a vizeletminták 12 hónapos, -80°C-os tárolását követően IN-nel mérve a vizeletek albumin-koncentrációját a csökkenés nem volt szignifikáns (5%), míg HPLC-s módszerrel való mérés során szignifikáns, 29%-os csökkenést észleltek. Ezt a megfigyelést támasztja alá az a vizsgálatunk is, mely során 2,5 évig -80°C-on tárolt mintákban 24%-os csökkenést észleltünk a HPLC-s albuminuria meghatározás során. A hosszú távú vizelet-tárolás során tapasztalt szignifikáns albuminkoncentráció-csökkenés redukálhatja az albuminuria mortalitási prediktív erejét, ahogyan ezt az IN-es módszer által mérhető albuminuria esetében már be is bizonyosodott hosszú ideig tartó, -20 C-on történt tárolás esetén (330). A kérdést azonban csak prospektív vizsgálattal lehet majd megválaszolni.

Brinkman és munkatársai kutatási eredményeihez hasonlóan mi is összefüggést találtunk a vizelet pH-ja és a HPLC-s albuminuria-csökkenés között. Brinkman és munkatársai lehetséges magyarázatként az albumin alacsonyabb pH-n bekövetkező fokozott aggregációját/dimerizációját

vetették fel, mivel az albumin izoelektromos pontja 4,7-es pH értéknél van (330). Az irodalomban eddig azonban csak a szarvasmarha szérumalbumin enyhe savas közegben bekövetkező dimerizációját vizsgálták (334), humán vizeletalbumin dimerizációs készségére adatot nem találtunk. HPLC-s módszerünk segítségével vizsgálni tudtuk a vizeletalbumin dimer és monomer formájának változását 2,5 év távlatában. Eredményeink azt mutatják azonban, hogy a vizeletalbuminnak csak a monomer formája csökkent szignifikánsan, míg a dimer forma nem mutatott szignifikáns változást.

Az általunk származtatott DMR hányadosok - melyek a dimer vizeletalbumin %-os arányát mutatja a monomerhez képest – 2,5 év alatt észlelet szignifikáns változása korrelált a vizeletek pH-jával. Azonban mind a DMR hányadosok változása, mind a pH-val való összefüggés kizárólag a monomer vizeletalbumin forma változásának következménye. Ezen eredményünk is megerősíti azt a feltételezést, hogy a HPLC-vel mérhető vizeletalbumin-koncentrációjának hosszútávon mérhető csökkenése pH-függő, továbbá arra is enged következtetni, hogy ez a szignifikáns csökkenés nem magyarázható csak az albumin dimerizációjával. Így más mechanizmusok - mint pl. degradáció, vagy nagyobb egységekké történő aggregáció - lehetnek a csökkenés okai.

Szintén ismert tény, hogy a nem immunreaktív vizeletalbumin egy proteolítikusan részben emésztett, de nem-denaturáló közegben diszulfid hidak által még intakt mólsúlyú (66 kDa) albuminforma, mely redukáló ágensek hatására kisebb darabokra fragmentálódik (238). Vizsgálatunk során mértük mind a tárolt, mind a frissen gyűjtött vizeletek összes szabad szulfhidril csoportjainak mennyiségét, hogy megállapítsuk, vajon a szabad szulfhidril csoportok szerepet játszanak-e a HPLCvel detektálható albuminuria csökkenésben a diszulfid kötések redukálása, így a fragmentálódás elősegítése által. Célunk volt ezen kívül a szabad szulfhidril csoportok koncentrációját befolyásoló faktorok felderítése is. Friss vizeletben szoros összefüggést találtunk a vizelet szabad szulfhidril csoport mennyisége és a pH között, amely összefüggés a tárolt vizeletekben már nem volt kimutatható. Továbbá azt találtuk, hogy a szabad szulfhidril csoportok száma szignifikánsan csökkent a tárolt vizeletmintákban. Ez azt jelenti, hogy a vizeletnek potenciálisan magas redukáló kapacitása van, amely pH-függő, és amely szerepet játszhat a HPLC-vel mérhető albuminuria csökkenésben azáltal, hogy a nem immunreaktív albumint fragmentálja.

Következtetésként levonhatjuk, hogy a hosszú idejű, -80°C-os tárolás után HPLC-s albuminuria-mérés megbízhatatlan eredményt ad, amely félrevezetheti a klinikust. A vizeletalbumin koncentrációjának HPLC-s mérésére csak friss minta használata javasolt. A tárolás során a HPLC-vel mért pH-függő albuminuria-csökkenés egyik oka lehet a szulfhidril csoportok nagy száma a vizeletben, amelyek mennyisége szintén pH-függő. Ezen kívül a vizelet és a vese egyéb, eddig nem vizsgált tulajdonságai is szerepet játszhatnak a kevésbé stabil, nem immunreaktív albumin-forma mennyiségének csökkenésében, így pl. a vesében zajló glikoxidációs folyamat, amely megváltoztathatja a vizelet szulfhidril tartalmát és ezen keresztül a mérhető albumin mennyiségét.

5.10. Megbeszélés

5.10.7. Glomeruláris típusú haematuria modellezése karbonil- és oxidatív stresszel

Vizsgálati eredményeink szerint *in vitro*, MGO adásával ugyanolyan morfológiai elváltozások alakultak ki a vörösvértesteken, mint amelyek az ún. glomeruláris eredetű vérzésre (GV), - haematuriára jellegzetesek. Ezek a vörösvértest elváltozások általában immunpatogenetikai alapon kialakuló glomerulonephritisekben, de más vesebetegségben, pl. Alport syndromában is észlelhetőek a vizelet üledékben (335). A GV elváltozások ismerete alapvetően fontos a vesebetegségek differenciál diagnoszikájában, mert jelenlétük glomeruláris eredetű vesebetegségre utal.

Az eddigi elképzelések szerint a vörösvértestek membránkárosodása, a GV, a vese tubulusokban alakulna ki ozmotikus stressz következtében, vagy a glomeruláris bazális membránon való átpréselődéskor szerzett károsodás miatt jönne létre (336). Azonban azt is kimutatták, hogy önmagában az ozmotikus stressz következtében nem alakul ki glomeruláris típusú vörösvértest (337). Ugyanakkor megkérdőjelezhető, hogy önmagában a vörösvértestek glomeruláris bazális membránon való átjutása hozna létre dizmorf vvt-ket, mert a vvt-morfológiát a kacsdiuretikumok használata is befolyásolja (338).

Alport syndromában szintén glomeruláris eredetű vörösvértesteket találunk (335). Felvetődik, hogy ilyenkor a gyulladás indukálta karbonil stressz vajon kialakulhat-e. Újabb tanulmányok szerint a gyulladásos elváltozások az Alport nephropathiában is kimutathatóak (339, 340).

Az MGO citotoxikus hatásának következményeként dizmorf vörösvértestek voltak megfigyelhetők, ami glomeruláris haematuria esetén is észlelhető. A dizmorf vvt-k kialakulása koncentrációfüggő, és már 10 perc inkubáció után is észlelhető volt.

A vörösvértestek membránlefűződésének egy lehetséges mechanizmusa a karbonil stressz. Jól ismert azonban a karbonil és az oxidatív stressz szoros összefüggése, ezért vizsgáltuk, hogy az MG okoz-e oxidatív stresszt és szabadgyök-képződést? Az MG hatását, a ferro vaséhoz, mint pozitív kontrollhoz hasonlítottuk. A ferro vas és az MG együttes alkalmazása kisebb hatással járt, mint a vas önmagában, ami a vasnak az MG-vel kialakított interakcióját valószínűsítette.

Mivel a ferro vassal és antioxidánsokkal (SOD, kataláz, trolox és GSH) végzett kísérletekben mindegyik antioxidáns hatásosnak bizonyult, kimondható, hogy a ferro vas hatására kialakuló diklorofluoreszcein fluoreszcencia létrejön a szuperoxid szabad gyök (SOD függő), a hidrogénperoxid és hidroxil szabad gyök (kataláz függő), valamint a lipid peroxidáció (trolox függő) hatására is. A dezferrioxamin mezilát is csökkentette a ferro vas indukálta diklorofluoreszcein fluoreszcenciát, ami azt jelentheti, hogy a dezferrioxamin mezilát oxidálta a ferro vasat ferrivé, majd a ferri vasat komplexálva, megakadályozta annak redox ciklusát. Tehát a diklorofluoreszceint oxidálhatja a szuperoxid- és a hidroxil szabadgyök, a hidrogén-peroxid és a lipid-peroxidok. Az intracelluláris

kálcium-akkumulációt ezek szerint kiválthatja ezek bármelyike (lásd antioxidáns kísérletek Fura-2-AM eredményei, a kataláz függő eredményekről nem tudunk nyilatkozni, az említett interakció miatt).

A dezferrioxamin gátolta az MG diklorofluoreszceinre és a Fura-2AM-re kifejtett hatását, ami arra utalhat, hogy az MG oxidatív stresszen keresztül okozhat intracelluláris kálcium-akkumulációt. Az extracelluláris vasnak jelentős szerepe lehet az MG hatásának kifejlődésében, hiszen a dezferrioxamin sejtbe történő transzportja lassú (261). A GSH védő hatása nem csak az antioxidáns mechanizmuson keresztül valósulhat meg, hiszen elősegítheti az MG metabolizmusát a glioxaláz anyagcsereúton át.

Az MG-vas-interakció további részleteire világítottak rá az ESR-vizsgálataink. Az MG-Larginin rendszerben képződött ESR-jel intenzitását a ferri vas növelte a ferro csökkentette. A ferro vasat oxidáló és a ferrit komplexáló dezferrioxamin, ami gátolja a komplexált ferri vas redox ciklusba belépését, kivédte a ferri vas hatását. Az, hogy a ferro vasat komplexáló ferrozin növelte a ferri vas hatását, tovább erősíti azt, hogy az MG redukálja a ferri vasat ferrová, amely csökkenti a jelintenzitást. Feltételezésünk szerint a folyamat lépései a következők lehetnek: a ferri vas elektron akceptorként az MG donorként viselkedik ebben a rendszerben, amelyben így a ferri vasból ferro, az MG-ből MG anion szabad gyök képződik, amire irodalmi adatok is utalnak (256). A ferro vasat az MG kelálhatja és ez a komplex reagálhat el az L-argininnel. Ez a komplex reakcióképesebb, mint az MG önmagában, ezért a szabadgyökös jelintenzitás nagyobb az ESR-vizsgálatok során.

A ferro vasat keláló ferrozin megakadályozza a ferro vasat abban, hogy elektrondonorként működjön, ezért az ESR-vizsgálatokban a ferro vas által csökkentett jelintenzitást megnövelte. Hipotézisünk szerint a ferro vas-MG komplex átmeneti szabadgyökös reakció nélkül, direkt módon képes reagálni az L-argininnel, felgyorsítva így a színes termékképződést, mint azt 490 nm-nél történt spektrofotometriás vizsgálatainkkal igazoltuk. Ezzel a hipotézissel összhangban állnak a ferri vassal végzett spektrofotometriás méréseink is, hiszen ezek alapján a ferri vas katalizálja a színes termék képződését, de lassabban, mint a ferro vas. Az MG vaskeláló képessége magyarázhatja azt is, hogy a ferro vas+MG miért nem okozott nagyobb intracelluláris kálcium-akkumulációt a vörösvértest modellben, mint a ferro vas önmagában. A ferro vas felgyorsíthatja az MG néhány hatását, de csökkentheti azok intenzitását.

Az MG-vvt modellünk példa lehet a karbonil- és az oxidatív stressz szétválaszthatatlan együttes fellépésére és ugyanakkor az albuminuriához hasonlóan hangsúlyozza a vesében zajló glikoxidációs folyamatok jelentőségét és kimutathatóságát. Ez a glikoxidáció okozhatja a jól ismert glomeruláris hematuria kialakulását, amit a diagnosztikában jól tudunk hasznosítani.

5.10. Megbeszélés

5.10.8. Végállapotú veseelégtelenség (LXV)

Végállapotú veseelégtelenségben (ESRD) szenvedő betegeink esetében azt vizsgáltuk, hogy egy AGE, a karboximetil-lizin szérumszintje hogyan befolyásolja a teljes és a cardiovasculáris halálozást. Immunhisztológiai vizsgálattal AGE-akkumulációt találtak az atherosclerotikus plakkban diabeteses és nem diabeteses betegekben (341) valamint ESRD-ben (342). Mégis, mindezidáig a keringő AGE-szintet nem tartották prediktornak az ESRD-ben szenvedő betegek prognózisát illetően (343). Busch és munkatársai szerint a magasabb AGE-szint nem okoz fokozott kockázatot a cardiovasculáris betegségek kialakulása tekintetében veseelégtelenségben, krónikus dialíziskezelésben részesülőkben és vesetranszplantáltakban (344). Suliman és munkatársai predializált betegeken végzett vizsgálataikban nem találtak összefüggést a plazma pentozidin-szintje és a túlélés között (345). Ez a vizsgálat (mivel a vesepótló kezelés megkezdése előtt indult) figyelmen kívül hagyta a dialízis kezelés el nem hanyagolható hatását a követés során. Schwedler és munkatársai eredményei alapján 312 krónikusan hemodializált beteg 32 hónapos követése során a magasabb szérum AGE-szint jobb túléléssel járt együtt. Jól ismert azonban, hogy a malnutríció magasabb mortalitással jár a hemodializált betegekben (346). A Schwedler-tanulmányban a magasabb AGE-csoport magasabb szérumalbumin-, -kreatinin- és -karbamidnitrogén-szintje jobb tápláltsági állapotra utalhat, ami magyarázhatja ezeknek a betegeknek a jobb túlélését (347). Ugyanebben a tanulmányban a magas CML-csoportban a kezdeti cardiovasculáris betegség-előfordulás is alacsonyabb volt, ami szintén magyarázatul szolgálhat a jobb túlélésre.

A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan (348,349) mi is jelentősen emelkedett szérum-CMLszintet találtunk dializált betegeinkben, de a legfontosabb megfigyelésünk szerint a szérum-CML-szint prediktora az összmortalitásnak. Többváltozós Cox-regressziós modellben a szérum CML a mortalitás független prediktorának bizonyult. A szérumalbumin-, a szérumkarbamidnitrogén- és a szérumkreatininszint hasonló volt a két csoportban (alacsony és magas CML), ami arra utalhat, hogy tápláltsági állapotuk sem különbözött.

A kor és a kezdeti cardiovasculáris betegség jelentősen befolyásolta tanulmányunkban az összmortalitást, amihez hasonló eredményt már többen is leírtak (346,347, 350). Ami a szubklinikai gyulladást illeti egyes szerzők nem találták szignifikáns determinánsnak (345), míg mások (347,350) a szérum CRP-szint és a mortalitás között szorosabb összefüggést találtak (HR = 1,13 és 1,16) mint mi (HR = 1,017).

A kezdeti magas cardiovasculáris betegség-előfordulás kialakulásáért ugyanazok a tényezők lehetnek a felelősek, mint amelyek miatt Magyarországon általában is magasabb a cardiovasculáris mortalitás, mint Nyugat-Európában (351)

Az emelkedő keringő AGE-toxin-szint nem csak a vese állapotromlását, hanem az atherosclerosis kialakulását is elősegíti. ESRD-ben igazoltuk, hogy a szérum-CML-szint fontos prediktora a cardiovaszkuláris mortalitásnak. DM-ben a nem enzimatikus glikáció következtében emelkedő szérum-AGE-szint károsíthatja a vesét és proteinuriához vezet. IgANP-ban az oxidatív

stressz hasonló eredményű lehet, szintén a proteinurián keresztül is. Az AGE-k és a proteinuria károsíthatják a vese kiválasztó működését, ami jelentős szérum-AGE-szintemelkedéshez vezetve circulus vitiosust és atherosclerosist is okoz. Ezt a folyamatot az 5.10.8.1. ábra szemlélteti:



5.10.8.1. ábra Az AGE-emelkedés és a következményes proteinuria nephronvesztéshez, ez circulus vitiosushoz és fokozott atherosclerosis-veszélyhez vezet.

5.10. Megbeszélés

5.10.9. Dohányzás (LII)

Eredményeink arra utalnak, hogy dohányfüst tartalmú puffer (SB) hatására az endotélsejtek cGMP-termelése koncentráció- és időfüggően csökken. Az SB hatását kivédik a tiol-tartalmú antioxidánsok, de a SOD, a kataláz és a dezferrioxamin hatástalannak bizonyult. Igazoltuk, hogy endotélsejtekben a dohányfüst koncentráció- és időfüggően gátolja a bradikinin-kiváltotta kálciumbeáramlást és az SB eme gátló hatása is kivédhető volt GSH-val.

Az SB az agonista-receptor interakciótól az NO-guanilát cikláz-cGMP út bármely pontjáig károsíthat, és ezek mindegyike a cGMP keletkezésének csökkenéséhez vezethet. Mivel a nátrium nitroprusszidon keresztüli direkt stimulálás is károsodott, kimondhatjuk, hogy az endotélsejtek guanilát cikláz enzime nagy valószínűséggel károsodik vagy inaktiválódik.

Oxidatív stressz során a nem szelektív Na⁺ csatornákon keresztül Na⁺ beáramlás következik be, aminek hatására a sejtek depolarizálódnak (352). Az SH-enzim csoportba tartozó Na⁺/K⁺-ATPáz működését aktiválja ugyan az így megemelkedett intracelluláris nátrium koncentráció, de az egyidejű oxidatív stressz miatti gátlása megakadályozza, hogy az enzim a magas intracelluláris Na⁺-koncentrációt csökkentse, ami miatt a depolarizáció megmarad. A depolarizáció inaktiválja az agonista-indukálta Ca²⁺-beáramlást (352).

Vajon a dohányfüst melyik alkotóeleme károsítja az endotélsejteket? A dohányfüst számos összetevőt tartalmaz, és nehéz megmondani, hogy melyikük lehet felelős az endotélsejt károsodásáért. A SOD, a kataláz, és a DFO hatástalansága alapján valószínűleg kizárható a H₂O₂, a szuperoxid és a hidroxil szabad gyök szerepe. A DFO megakadályozza a lipid-peroxidáció kialakulását is. Hatástalansága kísérleteinkben valószínűtlenné teszi a lipid-peroxidáció lehetőségét is.

A GSH és az egyéb -SH csoportot tartalmazó molekulák hatékonysága, mint nem specifikus antioxidánsoké, mégis azt mutatja, hogy oxidatív károsodással kell számolnunk. A dohányfüstben jelentős mennyiségű formaldehidet találtunk. A formaldehid két módon károsíthatja a fehérjéket; vagy keresztkötéseket hozhat létre a fehérjék -NH₂ csoportjai között vagy a fehérjék -SH csoportjához kötődve károsítja a fehérjéket és így inaktiválhatja azokat. Ezekkel a reakciókkal a dohányfüstben levő formaldehid a szabad gyökök és a nitrit toxikus hatását fokozhatja. Ezért feltételezhető, hogy az -SH tartalmú gyökfogók részben a dohányfüstben levő formaldehid károsító hatását védték ki.

A dohányfüst okozta endotélkárosodás részben az oxidatív stresszen, részben a karbonil stresszen keresztül valósul meg. A dohányfüst-hatás következménye az endotéliumban az agonista indukálta kálciumbeáramlás és a cGMP-termelés csökkenése.

Mivel az inzulinhatáshoz intakt endotéliális NO-cGMP jelátvitel szükséges, ahhoz, hogy az izom nutritív prékapilláris arterioláit meg tudja nyitni és ez által az inzulin el tudjon jutni a parenchymas sejtekig, ezért ennek a rendszernek a dohányfüst okozta károsodása anyagcsere-eltéréseket is előidézhet.

Először igazoltuk, hogy a dohányfüst koncentráció- és időfüggően növeli mind a Ser(1177)-eNOS, mind a Thr(495)-eNOS foszforilációját, miközben a totál eNOS protein mennyiség változatlan marad. A foszfo-Ser(1177) az eNOS aktivációját (171,173, 353-355), míg a foszfo-Thr(495) az enzim aktivitásának csökkenését eredményezi (171,173). Kísérleteinkben a dohányfüst mindkét pozíció fokozott foszforilációját eredményezte, mégis nagyobb mértékben a Thr(495) foszforilációjához vezetett. Ez arra utalhat, hogy az aktiváló/gátló foszforiláció aránya a gátlás irányába mozdult el. Ezek az eredmények ellentmondanak a korábbi reciprok foszforiláció-defoszforiláció elméletének.

A redukált glutation (GSH) nem specifikus szabadgyök- és aldehidelfogóként működik. Ebben a tanulmányunkban a GSH csökkentette mindkét foszforilációs hely foszforiláltságát, azonban a Thr(495) pozícióét jobban mérsékelte.

A dohányfüst a formaldehid tartalma révén is kifejtheti a hatását az eNOS-ra, lévén hogy a formaldehid direkt módon képes kötődni a fehérjék tiol csoportjához. Zhang és mtsai szerint a dohányfüst csökkenti az eNOS enzimatikus aktivitását, amely hatást a tiol-donor N-acetil-cisztein képes megfordítani (356). Így tehát a dohányzás okozta betegségekre is egyszerre lehet jellemző az oxidatív és a karbonil stressz, éppen úgy, mint a cukorbetegségre, vagy a vesebetegségekre.

Általánosan elfogadott, hogy az NO termelésére akkor képes az eNOS, ha homodimer struktúrájú. A monomer forma nem NO-t, hanem szuperoxid szabad gyököt termel (357). Mi azt találtuk, hogy az akut dohányfüsthatás következtében az eNOS koncentráció- és időfüggően szétesik, csökken az eNOS-dimer/monomer arány és ezt a disszociációt a GSH gátolta. Eredményeinkhez hasonló következtetésre jutottak mások a tioredoxin/tioreduktáz rendszer vizsgálatával és megállapították, hogy a tiol csoportok intakt volta szükséges a dimer eNOS-struktúra megmaradásához (358). Peroxinitrit vagy szuperoxid szabad gyök oxidálja a tiol csoportokat, cink szabadul fel és diszulfidkötés képződik, ami az eNOS szétkapcsolásához vezet (359).

A szerin/treonin kináz Akt (PKB) szerepet játszik a sejttúlélésben, az inzulin intracelluláris jelátvitelében és foszforilálja az eNOS-t a Ser(1177) pozícióban (353,354,360), aktiválva azt. A dohányfüst koncentráció- és időfüggő módon csökkentette az Akt serkentő foszforilációját a Ser(473) pozícióban. Mivel az Akt foszforilációját a PI3-K befolyásolja, megvizsgáltuk a szelektív PI3-K inhibitor LY-294002 (361) hatását. Azt találtuk, hogy LY-294002 jelenlétében az eNOS dohányfüstre bekövetkező Ser(1177) foszforilációja tovább nőtt, ami arra utal, hogy nem a PI3-K/Akt jelátviteli útvonal felelős a dohányfüst okozta Ser(1177)-eNOS-foszforilációjért.

További protein kinázok hatását is vizsgáltuk, így pl. a PKA és a PKC esetleges szerepét is. Az Akt-n kívül a PKA útvonal is fontos szerepet játszhat az eNOS foszforilációjában, például shear-stress (175) vagy bradikinin hatására (176).

A PKC számos jelátviteli útvonalban játszik fontos szerepet (362). A PKCß szubtípus endotéliális dysfunctiót okoz, gátolja az inzulin kiváltotta eNOS-expressziót és így csökkenti a sejtek NO-termelő kapacitását (363,364). Sőt a PKC csökkenti az eNOS aktivitását is azáltal, hogy a gátló pozícióban, a Thr(495) helyen foszforilációt vált ki (171-174, 365).

A PKA szelektív gátlója a H-89, nem befolyásolta sem a Ser(1177), sem a Thr(495) foszforilációját, azaz a PKA nem játszik szerepet a dohányfüst indukálta eNOS foszforilációban. A PKC útvonal szelektív inhibítora a Ro-318425 viszont csökkentette a dohányfüst által okozott eNOS-foszforilációt a Thr(495) pozícióban. Sőt a PKCß izoforma szelektív gátlója, a ruboxistaurin, szintén csökkentette az eNOS foszforilációját a Thr(495) pozícióban. Így tehát feltételezhetjük, hogy a PKC,

sőt a PKCß által kiváltott gátló típusú eNOS foszforiláció a Thr(495) pozícióban központi szereppel bírhat a dohányfüst eNOS hatásában.

Összefoglalva, a dohányfüst az endotélsejtekben akutan poszttranszlációs fehérjemódosulásokat vált ki megváltoztatva az eNOS foszforilációját és pedig úgy tűnik, hogy inkább a gátló foszforiláció kerül túlsúlyba. Ebben a foszforilációs változásban nincs szerepe a PKA-nak és a PI3-K/Akt útvonalnak, a PKC-nek azonban jelentősége lehet. A dohányfüst ráadásul csökkenti az eNOS dimerizációját, amelynek hátterében oxidatív károsodás lehet, mert GSH kivédi azt. A későbbiekben szóba jöhet a dohányzás káros hatásainak PKCß-gátlóval történő kezelése is, erről azonban jelenleg nem állnak rendelkezésünkre klinikai adatok.

Humán vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a dohányfüst akutan rezisztencia index (RI) csökkenést okoz az arteria renalis első szegmentális erében, amely valószínűleg vazodilatációs eredetű és így a vesében hyperfiltratióhoz vezet. Patkányból izolált arteria renalis első szegmentális erén bebizonyítottuk, hogy az arteria renalis ágaiban a dohányfüst hidrogén-peroxid révén okoz vazodilatációt, és ez a hatás endotéliumtól, szolubilis guanilát cikláztól, a kálcium dependens káliumcsatornától és az ATP dependens káliumcsatornától független volt.

Komoly ellentmondásnak tűnik ez, hiszen ezidáig az *endotélfüggő* NO-termelés központi vazodilatációs szerepéről esett szó, és arról, hogy a dohányfüst ezt hogyan károsíthatja! További értelmezési nehézséget okoz az, hogy egyidejűleg lép fel renalis vazodilatáció és vérnyomás (MAP) emelkedés.

Korábbi vizsgálatok szerint dohányzás hatására a légutak (365) és a véna portae (366) vérátáramlása növekszik. Ezek alapján feltételezzük, hogy a dohányfüst az arteria renalis relaxációján és az artériás középnyomás (MAP) emelésén, valamint az endotéldiszfunkción keresztül hiperfiltrációt és albuminuriát válthat ki (283-285).

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy az akut dohányzás átmeneti RI csökkenést és a renális artériák dialtációját okozza. Eredményeinkkel ellentétes adatokat közöltek Ritz és mtsai, melyek szerint az akut dohányzás a veseerek rezisztenciájának növekedését és a GFR csökkenését okozná (368). A két vizsgálat eredményeinek különbözősége fakadhat a tanulmányok kivitelezéséből és a vizsgáltak eltérő tulajdonságaiban fennálló különbségekből. Ritz és mtsai tanulmányába nőket és férfiakat is bevontak, míg mi csak férfiakat. Ráadásul az őáltaluk vizsgáltak keveset dohányoztak (10 cigaretta/nap), míg nálunk ez utóbbi érték 17,7±6,9 cigaretta/napnak adódott. A két vizsgálatban a veseerek rezisztenciája is eltérő módon került mérésre, ami miatt a mérési pontok időzítése is eltért.

In vitro vizsgálatainkban a patkányból izolált arteria renalis első oszlási ágai a dohányfüst vízoldékony extraktumára koncentrációfüggően relaxáltak. Eredményeink alapján nem valószínű, hogy a relaxációért a dohányfüst legtöbbet vizsgált összetevője a nikotin (369) lenne a felelős, ugyanis a nikotinmentes cigaretta ugyanolyan hatást váltott ki, mint a nikotinos. Ugyanakkor a nikotinossal

szemben a nikotinmentes dohányzás betegeinkben nem emelte a vérnyomást és a szívfrekvenciát, ami összhangban van az irodalommal (370). Kizárható a dohányfüst CO tartalmának szerepe is, mert az a szolubilis guanilát cikláz és a kálcium dependens káliumcsatornák aktiválásával fejti ki a hatását (371,372) és ezek gátlása nem befolyásolta a dohányfüst okozta vazorelaxációt. Humán vizsgálatok igazolták azt is, hogy 1 cigaretta elszívása után 30 perccel még mindig magas a dohányosok CO-szintje (370), a vazodilatáció viszont átmeneti csak mintegy 5 perces. Szintén a szolubilis guanilát cikláz (ODQ-val történő) gátlásának hatástalansága miatt kizárható az NO szerepe is, hiszen annak, a CO-hoz hasonlóan, ugyanaz a támadáspontja.

Ismert, hogy a dohányfüstben található, vagy a hatására a szövetekben képződő szabad gyökök módosíthatják az erek tónusát (165,373). A hidrogén-peroxid például endotélium és simaizom függő módon is kiválthat vazodilatációt (375). Patkány arteria carotis dohányfüsttel történő 6 órás inkubációja növelte a hidrogén-peroxid termelődését (373). Mások azt találták, hogy a dohányfüst bifázisos vazomotorválaszt okozott disznó prekontrahált koronária artériáin (376). A bifázisos válasz első gyenge kontrakcióját koncentrációfüggő relaxáció követte. Az utóbbi fázist növelte SOD-vel történő előinkubáció. Az ér endotéljének elroncsolása után, patkány vázizom arteriolájában, a kívülről hozzáadott hidrogén-peroxid (6x10⁻⁵ - 3x10⁻⁴M koncentrációban) szintén bifázisos választ okozott (377). Mi a tanulmányunkban 1-10%-os dohányfüstpuffert használtunk, amihez hasonlót alkalmaztak mások is (373,376). Azt találtuk, hogy a hidrogén-peroxidot bontó kataláz csökkentette a dohányfüst kiváltotta arteriarelaxációt, míg az SOD, amely a szuperoxid szabad gyök dizmutációja révén hidrogén-peroxidot kelt, növelte azt. Így tehát a dohányfüst vizes extraktuma, legalább is részben a hidrogén-peroxid révén váltja ki a renális artéria relaxációját, amely hidrogén-peroxid származhat magából a dohányfüstpufferből, vagy amelyet szuperoxid szabadgyökből az erek SOD enzime képez. Mivel a relaxáció megmarad az endotélium elroncsolása után is, feltételezhető, hogy elsősorban simaizomhatásról lehet szó. A szabad gyökök szabályozhatják ioncsatornák és transzporterek aktivitását; koronária artériákban a tiol csoportok oxidációja például redox-regulálta vazodilatációt okozhat az L-típusú kálciumcsatornák gátlása révén (378). A mi tanulmányunkban a GSH csökkentette a dohányfüst kiváltotta vazorelaxációt.

Ismert, hogy a báriumion gátolja a káliumcsatornákat és ezzel simaizom depolarizációt és ez által a feszültségfüggő kálcium-csatorna megnyílása révén vazokonstrikciót okoz (379). Ezzel összhangban azt figyeltük meg, hogy az arteria renalis BaCl₂ indukálta kontrakcióját az L-típusú kálcium-csatorna-blokkoló nifedipin csökkentette. Figyelemfelkeltő, hogy az 5%-os dohányfüstpuffer hasonló hatású volt. Ezek a hasonlatosságok felvetik annak lehetőségét, hogy a feszültségfüggő kálcium-csatorna redox eredetű gátlásának szerepe lehet a dohányfüst által kiváltott relaxáció kialakulásában.

Amennyiben a Krebs pufferben a NaCl-ot ekvimoláris LiCl-dal helyettesítjük, átmeneti kontrakció jön létre, ami a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporteren keresztül megvalósuló kálciumbeáramlás

hatására alakul ki (380). Kísérleteinkben a SEA0400, a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszport specifikus gátlója (381) csökkentette a Li⁺ által kiváltott kontrakciót, hasonló mértékben, mint az 1%-os dohányfüstpuffer. Ez azt támasztja alá, hogy a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszport befolyásolásának szerepe lehet a dohányfüst által indukált vazorelaxációban. Érdekes ilyen irányú megfigyelés szerint a H₂O₂ által létrehozott tiolcsoport-módosítás befolyásolhatja a cardiomyocyták Na⁺-Ca²⁺ cseretranszportját (NCX) (382).

Így tehát a dohányfüstpuffer hidrogén-peroxid tartalma lehet az egyik oka az arteria renalis dohányfüst hatására kialakuló *endotélfüggetlen* relaxációjának, melynek hátterében a simaizomzat Ltípusú kálcium-csatornái és a Na⁺-Ca²⁺ cseretranszporter módosítása állhat. Ugyanakkor az is ismert, hogy a hidrogén-peroxid egyes erekben a vazodilatációt másokban a vazokonstrikciót erősíti (lásd a kóros aminosavakról szóló következő fejezetet), ami magyarázhatja, hogy az arteria renalis dilatációjával egyidejűleg miért alakul ki MAP emelkedés.

Humán, retrospektív hisztológiai adataink feldolgozása kiegészíti az eddigi in vitro és humán eredményeinket. Amennyiben ugyanis a dohány ilyen jelentős endotéliális diszfunkcióhoz, nem endotélfüggő, akut renovaszkuláris vazodilatációhoz vezet, akkor felmerül annak lehetősége, hogy a vese glomerulusok ismét és ismét, minden egyes cigaretta elszívása kapcsán hiperfiltrációtól szenvednek, ami a diabeteses vesekárosodás kialakulásában és progressziójában fontos szerepet játszhat, sőt a nem diabeteses vesekárosodások némelyikének is lényeges tényezője lehet. Ez a vesekárosodás tankönyvi, ún. haemodinamikai oldala. Retrospektív hisztológiai vizsgálatunkban magas dohányzási prevalenciát (87%) írtunk le a Kimmelstiel-Wilson-léziót (KW) mutató 2-es típusú cukorbetegekben. Azoknál a 2-es típusú cukorbetegeknél, akiknél KW nem volt igazolható (non-KW) a dohányzás csak 35%-ban fordult elő, ami a válogatás nélküli magyar populációs előforduláshoz közeli érték (293). Az egyéb kockázati tényezők tekintetében a KW és a non-KW csoport nem különbözött. Tovább erősíti a noduláris glomerulosclerosis és a dohányzás közötti lehetséges kapcsolatot az is, hogy a nem diabeteses noduláris glomerulosclerosisban szenvedők 100%-ban dohányoztak, és így e csoport pozitív kontrollként szerepeltethető. Amennyiben a csomagéveket, a dohányzás dózisát hasonlítottuk össze, akkor is a noduláris glomerulosclerosist mutatók magasabb értékét kaptuk, a noduláris elváltozást nem mutató cukorbetegekhez képest.

Humán vizsgálatunkban és in vitro kísérletünkben is igazoltuk a dohányfüst renális artériát (extrarenális) tágító és így hiperfiltrációt okozó hatását. Ez az ismétlődő haemodinamikai elváltozás fontos szerepet játszhat a noduláris glomerulosclerosis és a proteinuria kialakulásában. Előző vizsgálataink alapján egyidejűleg endotéliális károsodással, eNOS dysfunctióval és ennek következtében intrarenális haemodinamikai zavarokkal is számolnunk kell. Retrospektív, kis beteglétszámú vizsgálatunk természetesen nem alkalmas direkt ok-okozati összefüggések feltárására, ehhez prospektív, nagy beteglétszámon végzett tanulmányok szükségesek.

Felvetésünk csupán annyi, hogy a dohányfüst okozta endotéliális diszfunkció, valamint az endotélfüggetlen arteria renalis vazodilatáció a renális hiperfiltráció súlyosbításán keresztül noduláris glomerulosclerosishoz vezethet.

6. VIZSGÁLATOK 2: Egy bizonyos szabad gyök, a hidroxil szabad gyök által kiváltott oxidatív stressz diabetes mellitusban és vesebetegségekben

Rövidítések: ATP = adenozin-trifoszfát, **CKD** = veseelégtelen, nem-diabetesesek, **CONTR** = kontroll egyének csoportja, **DIAB** = 2-es típusú cukorbetegek, **DIAB-CKD** = vesebeteg, 2-es típusú cukorbetegek, **DM CAT** = 2-es típusú cukorbeteg kataraktások csoportja, **DM** = diabetes mellitus, **DOPA** = 3,4-dihidroxi-fenilalanin, **Fex** = frakcionált exkréció, **HbA**_{1c} = hemoglobin A_{1c}, **HPLC** = high performance liquid chromatography, **m-Tyr** = meta-tirozin, **non-DM CAT** = szenilis kataraktások csoportja, akiknek nem volt cukorbetegségük, **o-Tyr** = orto-tirozin, **Phe** = fenilalanin, **Fyr** = para-tirozin, **Tyr** = tirozin, **UV** = ultraibolya,

6.1. Aminosavak oxidációs termékei

Az aminosavak oxidációs termékei stabil és specifikus markerei a szabadgyök-termelésnek (283). Az ún. reaktív oxigén termékek (ROS) mint pl. a szuperoxid és hidroxil szabad gyök, vagy az erélyes oxidáló hatású hidrogén-peroxid és a peroxinitrit képes oxidálni az aminosavak és a fehérjék bizonyos csoportjait (384,385). Az aromás oldalláncú aminosavak különösen érzékenyek az oxidatív stresszre és termékeik stabilak, mint pl. a ditirozin (386).

Az esszenciális fenilalanin (Phe) aminosav fiziológiásan a fenilalanin hidroxiláz enzim hatására para-tirozinná (pTyr) alakul. Egyéb izoformái a tirozinnak fiziologiásan nem fordulnak elő. Hidroxil szabad gyök jelenlétében a fenilalanin nem-enzimatikusan orto- (o-Tyr), meta- (m-Tyr) és para-tirozinná (p-Tyr) alakulhat (6.1.1. ábra).

dc_360_171



o-Tyr

Ahol $R = CH_2CH(NH_2)COOH$

6.1.1. ábra A fenilalanin (Phe) konverziója orto-, meta- és para-tirozinná (o-, m-, p-Tyr). A vastag nyíl (→→) jelöli a fiziológiás, enzimatikus reakcióirányt, a vékony nyilak (→→) azokat az irányokat, amerre a reakció hidroxil szabad gyök hatására mehet. OH = hidroxil szabad gyök.

Mint azt a 6.1.1. ábra mutatja p-Tyr képződhet enzimatikusan és hidroxil szabad gyök hatására is, míg o- és m-Tyr csak hidroxil szabad gyök hatására képződik, ezért ezek jó markerei a hidroxil szabad gyök jelenlétének (385,387).

Az o- és a m-Tyr-t hidroxil szabadgyök-markerként használták pl kataraktában (388) vagy miokardiális ischaemia-reperfuzióban (389). Az o- és m- Tyr akkumulációja összefüggést mutatott a fokozott malondialdehid-képződéssel (390), az emelkedett NADPH-oxidáz aktivitással és a fokozott zsírsav oxidációval (391) vagy a csökkent redukált glutation szinttel (392). Az oxidált aminosav-származékok jobban használhatók, mint az egyéb oxidatív stressz markerek, mert specifikusak, stabilak és általában nem képződnek arteficiálisan a mintaelőkészítéskor. Az o- és m-Tyr viszonylag egyszerűen kimutatható autofluoreszcenciája alapján (393).

6.2. Oxidált fenilalanin-származékok és a vese (XIX)

6.2.1. Bevezetés

Az aminosavak a glomerulusokban szabadon filtrálódnak és a proximális tubuláris epithelsejtekben reabszorbeálódnak. A reabszorbció függ a molekula természetétől, kémiai struktúrájától. A Phe és a p-Tyr a neutrális aminosavakat reabszorbeáló transzporter révén szívódik vissza. Ez a folyamat nagyon hatékony, hiszen a filtrált aminosavaknak csak 1 %-a ürül ki végül is a vizelettel (394) Az aminosavakon kívül oligopeptidek is ürülnek a vizeletben, amelyek a kefeszegély

peptidázai által képzett fehérjefragmentumok. A Phe és a p-Tyr frakcionált exkréciója (Fex) 1% körüli humán viszonylatban (a p-Tyr átlag Fex értéke 1,18% és a Phe-é 0,9%, 394).

Célkitűzésünk a p-, m-, o-Tyr és Phe koncentrációinak mérése volt vizeletben és szérumban. Kontroll, egészséges önkéntesek, 2-es típusú diabetesesek, krónikus vesebetegek és cukorbetegvesebetegek mintáit vizsgáltuk. Tanulmányoztuk a kapcsolatot a vizelet 8-epi-prostaglandin- $F_{2\alpha}$ ürítés, mint a lipid-peroxidáció egyik mérőszáma és a hidroxil szabad gyök marker, o-Tyr között. Vizsgáltuk a fiziológiás p-Tyr és a hidroxil szabad gyök által képzett Phe-származékok veseeliminációját.

6.2.2. Betegek és módszerek

6.2.2.1. Betegek

Keresztmetszeti vizsgálatunkban 4 csoportot hasonlítottunk össze: (1) nem-diabeteses, nemvesebeteg kontrollokat (CONTR, n=14), (2) III. stádiumú (mérsékelt GFR-csökkenés, a National Kidney Foundation *Definition and Classification of the Stages of Kidney Disease* szerint: GFR: 30-59 ml/perc) veseelégtelen, nem-diabeteseseket (CKD, n=12), (3) nem-vesebeteg, 2-es típusú cukorbetegeket (DIAB, n=17), (4) III. stádiumú vesebeteg, 2-es típusú cukorbetegeket (DIAB-CKD, n=19). A csoportok klinikai jellemzőit a 6.2.2.1.1. táblázatban tüntettük fel.

6.2.2.1.1.	táblázat A	A betegcso	portok klinika	i jellemzői.

	CONTR	CKD	DIAB	DIAB-CKD
Ν	14	12	17	19
Nem (férfi/nő)	4/10	5/7	7/11	8/12
Kor (év)	61	54	62	69
	(54-65)	(51-65)	(57-69)	(59-73)
Szérum CN	4,8	12,3 ^a	7,3 ^b	16,2 ^{a c}
(mmol/l)	(4,1-6,0)	(10,2-15,8)	(6,5-9,5)	(13,1-23,9)
Szérumkreatinin	79	190 ^{a c}	81	196 ^{a c}
(µmol/l)	(70-90)	(147-255)	(68-88)	(173-257)
Kreatinin clearance	109	31 ^{ac}	109	38 ^{a c}
- mért (ml/perc)	(83-140)	(16-33)	(93-124)	(23-41)
- számolt (Cockroft)	80	35 ^{ac}	109	38 ^{ac}
(ml/perc)	(71-87)	(30-56)	(90-144)	(25-53)
Fruktózamin (µmol/l)	-	-	267	259
			(243-304)	(235-367)
Hemoglobin A _{1c} (%)	-	-	8,65	7,13
			(8,22-9,59)	(6,23-9,01)

CONTR = egészséges kontrollok, CKD = veseelégtelenek, DIAB = 2-es típusú cukorbetegek, DIAB-CKD = veseelégtelen, 2-es típusú cukorbetegek, szérum CN = szérumkarbamid nitrogén. Az eredmények mediánját és az interkvartilis tartományt adtuk meg. A Mann-Whitney-U tesztet csak akkor alkalmaztuk, ha a Kruskall-Wallis teszt minden csoportra szignifikáns volt. ^a p<0,05 vs. CONTR, ^b p<0,05 vs. CKD, ^c p<0,05 vs. DIAB.

A nem-diabeteses veseelégtelen betegek diagnózisai a következők voltak: krónikus pyelonephritis (n=4), polycystás vesebetegség (n=3), nephrosclerosis (n=2), IgA nephropathia (n=1),

minimal change betegség (n=1) és vasculitis (n=1). A csoportok korban (p = 0,426), nemben (p = 0,723) egyeztetettek voltak.

A CKD és a DIAB-CKD csoport veseelégtelenségének súlyossága egyforma volt (szérumkreatinin: p = 0,795; 24 órás kreatinin clearance: p = 0,272; számolt kreatinin clearance [Cockroft-Gault]: p = 0,820). A DIAB és a DIAB-CKD csoport szénhidrát anyagcseréje hasonló volt (fruktózamin: p = 0,797; hemoglobin A_{1c}: p = 0,298). Nem volt különbség a csoportok között a következő paraméterek tekintetében sem: szérum GOT, GPT, LDH, ALP, összkoleszterin, HDL és LDL koleszterin (táblázatban nem mutatott eredmények).

Huszonnégy órás gyűjtött vizeletet és heparinizált plazmamintákat használtunk a vizsgálatokhoz. Mivel a diéta befolyásolhatja a vizsgálatokat, éhomi plazmamintákat vettünk. A rutin laboratóriumi vizsgálatokhoz standard metodikákat alkalmaztunk. A vizsgálatot a Pécsi Regionális Kutatás-Etikai Bizottság engedélyezte. Minden beteg beleegyező nyilatkozatot adott.

6.2.2.2. Módszerek

6.2.2.2.1. A szabad (nem-fehérje) orto- és para-tirozin kimutatása vizeletből és plazmából

Ishimitsu és mtsainak (395) minimálisan módosított módszerét használtuk. Ennek lényege röviden a következő volt: 24 órás gyűjtött vizelet vagy frissen nyert heparinizált plazma 250 µl-ét jégen tartottuk. Ehhez 125 µl 60%-os triklórecetsavat adtunk, összekevertük, 30 percig inkubáltuk jégen, mialatt a fehérjetartalom kicsapódott. A csapadékot centrifugálással (15.000 rpm, 10 percig, Eppendorf-csőben) eltávolítottuk. A felülúszót 0,2 µm fecskendő-szűrőn (Millipore) keresztülszűrtük, majd 20 µl injektáltunk a HPLC-be.

A kromatográfiát Shimadzu Class LC-10 AD_{VP} HPLC-vel végeztük (Shimadzu USA Manufacturing Inc.), a detektálásra Shimadzu RF-10 A_{XL} fluorescens detectort (Shimadzu USA Manufacturing Inc.) használtunk. Az aminosavakat (p-, m-, o-Tyr, Phe) autofluoreszcenciájuk alapján detektáltuk: a tirozinokat 275 nm-es excitációnál és 305 nm-es emissziós hullámhosszon, a Phe-t 258 nm-es excitációnál és 288 nm-es emissziós hullámhosszon. Licrospher C-18 ODS oszlopot és izokratikus futtatást használtunk. A mobil fázis 1%-os ecetsav és 1%-os nátrium-acetát vizes oldata volt. Külső standardot és a görbe alatti területet használtunk a koncentrációk kiszámolásához. Néhány esetben standard hozzáadásával bizonyosodtunk meg az elúciós időt illetően. A p-, m- Tyr-t és a Phe-t a Sigma-Aldrich Co.-tól (St. Louis, MO, USA), az o-Tyr-t az ICN Biochemicals Inc.-tól (Aurora, OH, USA) rendeltük. Két eredeti regisztrátum képét a 6.2.2.2.1.1. ábra mutatja:

dc_360_171



6.2.2.2.1.1. ábra Kontroll egyén (—) és veseelégtelen-cukorbeteg (– – –) vizeletének kromatogrammja. p-Tyr = para-tirozin, o-Tyr = orto-tirozin, CONTR = kontroll, DIAB-CKD = diabeteses-veseelégtelen beteg.

6.2.2.2.2. Vizelet 8-epi-prosztaglandin- $F_{2\alpha}$ meghatározása

A vizelet 8-epi-prosztaglandin- $F_{2\alpha}$ meghatározása kompetitív ELISA kit segítségével történt (Oxis Health Products, Portland, Oregon, USA).

6.2.2.2.3. Statisztika

Mivel az adatok többségének nem volt normális az eloszlása nem-paraméteres Kruskall-Wallis tesztet és Mann-Whitney U tesztet használtunk. Ugyanezért mediánt és interkvartilis tartományt adtunk meg.

6.2.3. Eredmények

6.2.3.1. A módszerek megbízhatósága

Mind az o-, mind a p-Tyr mérhető volt vizeletben, de a vizelet-Phe koncentrációja az esetek többségében a fluoreszcens HPLC módszer érzékenységi küszöbe alattinak bizonyult. A plazmában a p-, az o-Tyr-t és a Phe-t is kimutathatónak találtuk. Az o-Tyr alsó értéke 7 nmol/l-nek adódott az általunk használt eljárással. Az m-Tyr nem volt mérhető, mert vagy nem volt kimutatható, vagy más anyagokkal együtt eluálódott (amit standard hozzáadásával igazoltunk).

Az eljárás megismételhetőségét 9 vizelet és 9 plazma háromszor ismételt méréséből számoltuk. A mérések közötti időben a mintákat -20 °C-on tartottuk és minden alkalommal kiolvasztottuk a mintákat. A méréseket 3 különböző napon végeztük el és ugyanazt a készüléket használtuk, valamint a teljes mintaelőkészítést elvégeztük. Az átlagos inter-assay CV –k a következők

voltak: vizeletben 7,8 % a p-Tyr és 7,7 % az o-Tyr esetében, plazmában 7,1 % a p-Tyr és 6,3 % az o-Tyr esetében.

A 8-epi-prosztaglandin- $F_{2\alpha}$ vizelet kiválasztása tanulmányunkban 1049 ng/mmol kreatinin volt (medián), ami jó egyezést mutat a Framingham study group által megadott irodalomi értékkel (10-1600 ng/mmol kreatinin (396).

6.2.3.2. A para-tirozin plazmaszintje és vizeletürítése

A CKD csoportnak alacsonyabb plazma-p-Tyr-szintje volt, mint a CONTR vagy a DIAB csoportnak. A DIAB-CKD csoport plazma-p-Tyr-szintje szintén alacsonyabbnak bizonyult, mint a DIAB csoporté (6.2.3.2.1. táblázat).

	CONTR	CKD	DIAB	DIAB-CKD
Plazma-p-Tyr	55,96	28,45 ^{ac}	46,11	32,46 ^c
(µmol/l)	(35,62-56,97)	(25,60-34,42)	(42,09-49,31)	(29,15-39,01)
Vizelet-p-Tyr/kreatinin	4,27	1,80 ^{a c}	5,31	1,95 °
(µmol/mmol)	(3,03-5,23)	(1,58-1,97)	(4,26-9,28)	(1,45-3,90)
Vizelet-p-Tyr kiválasztás	23,62	18,78 [°]	68,78	20,44 ^c
(µmol/nap)	(16,79-81,57)	(5,10-40,98)	(43,84-113,63)	(9,11-29,74)
p-Tyr Fex	0,67	1,36	0,98	1,06
(%)	(0,56-0,79)	(1,09-2,14)	(0,73-1,35)	(0,71-3,54)
Plazma-o-Tyr	0,022	0,050	0,023	0,054
(µmol/l)	(0,013-0,054)	(0,024-0,145)	(0,015-0,029)	(0,019-0,378)
Vizelet-o-Tyr/kreatinin	0,034	0,175 ^a	0,291 ^a	0,479 ^{ac}
(µmol/mmol)	(0,0001-0,035)	(0,056-0,481)	(0,103-0,330)	(0,367-0,701)
Vizelet-o-Tyr kiválasztás	0,24	1,22 ^a	3,41 ^{a b}	4,03 ^{ab}
(µmol/nap)	(0,00-0,35)	(0,94-1,83)	(2,72-4,99)	(2,58-6,51)
o-Tyr Fex	7,86 ^d	27,28	125,29 ^a	111,89 ^ª
(%)	(3,81-12,08)	(8,55-373,02)	(69,32-140,35)	(68,79-185,90)

6.2.3.2.1. táblázat A para- és az orto-tirozin plazma-koncentrációja és vizeletürítése

CONTR = kontroll csoport, CKD = veseelégtelen csoport, DIAB = 2-es típusú cukorbetegek csoportja, DIAB-CKD = vesebeteg, cukorbetegek csoportja, p-Tyr = para-tirozin, o-Tyr = orto-tirozin; Fex = frakcionált exkréció. Az adatok mediánját és az interkvartilis tartományt adtuk meg. A Mann-Whitney-U tesztet csak akkor végeztük el, ha a Kruskall-Wallis teszt minden csoportra szignifikáns volt. ^a p<0,05 vs. CONTR, ^b p<0,05 vs. CKD, ^c p<0,05 vs. DIAB, ^d p<0,05 vs. p-Tyr Fex.

Hasonló eredményeket kaptunk akkor, ha az o- és p-Tyr értékeket a Phe-re korrigáltuk (táblázatban nem mutatott eredmények). A csoportok plazma-Phe szintjei nem különböztek (medián plazma-Phe szintek: Contr: 40,50 μ mol/l, CKD: 27,52 μ mol/l, DIAB: 31,08 μ mol/l, DIAB-CKD: 30,03 μ mol/l, p = 0,448).

A vizelet-p-Tyr-értékeket korrigáltuk a vizeletkreatinin koncentrációjára is. A csoportok vizeletkreatinin-koncentrációja nem különbözött (táblázatban nem mutatott eredmények). A CONTR csoport p-Tyr/kreatinin hányadosa magasabb volt, mint a CKD csoporté. A DIAB csoport p-Tyr/kreatinin hányadosa is magasabbnak bizonyult, mint a CKD, vagy a DIAB-CKD csoporté

(6.2.3.2.1. táblázat). A CKD és a DIAB-CKD csoport 24 órás p-Tyr ürítése alacsonyabb volt, mint a DIAB csoporté (6.2.3.2.1. táblázat). A plazma-p-Tyr-szint korrelált a vizelet-p-Tyr-koncentrációval (r = 0,468; p = 0,001).

6.2.3.3. A para-tirozin vese clearance-e és frakcionált exkréciója

A CKD és a DIAB-CKD csoport p-Tyr clearance-e alacsonyabb volt, mint a DIAB csoporté (0,34 [0,12-0,64] és 0,46 [0,18-0,74] vs. 1,13 [0,58-1,64] ml/perc, p < 0,05). A CONTR csoport p-Tyr clearance-e nem különbözött a betegcsoportokétól (CONTR: 0,63 [0,26-0,99] ml/perc). A p-Tyr frakcionált exkréciója (Fex) tekintetében nem találtunk különbséget a csoportok között (6.2.3.2.1. táblázat).

6.2.3.4. Az orto-tirozin plazmaszintje és vizelet-kiválasztása

Az o-Tyr plazmaszintekben nem találtunk különbségeket (p = 0,286, 6.2.3.2.1. táblázat). Hasonló eredményeket nyertünk akkor is, ha az adatokat a plazma Phe-szintekre korrigáltuk (táblázatban nem mutatott eredmények).

A betegcsoportok vizelet o-Tyr/kreatinin hányadosa magasabb volt, mint a CONTR csoporté és a DIAB-CKD csoporté magasabb, mint a DIAB csoporté. A három betegcsoport o-Tyr exkrécióját magasabbnak találtuk, mint a CONTR csoportét. A két diabeteses csoport 24 órás o-Tyr-exkréciója magasabbnak adódott, mint a CKD csoporté (6.2.3.2.1. táblázat). A plazma-o-Tyr nem korrelált a vizelet-o-Tyr-nal (r = 0,219; p = 0,130).

A vizelet-8-epi-prosztaglandin- $F_{2\alpha}$ /kreatinin hányados nem korrelált a plazma-o-Tyr-al (r = 0,04), a plazma-o-Tyr/Phe hányadossal (r = -0,06), a vizelet-o-Tyr/kreatinin hányadossal (r = 0,12) és a vizelet-o-Tyr kiválasztással (r = 0,16; p > 0,05 mindegyikre).

6.2.3.5. Az orto-tirozin vese-clearance-e és frakcionált exkréciója

Nem találtunk különbséget az o-Tyr clearance tekintetében a csoportok között (CONTR: 12,21 [2,13-21,26]; CKD: 5,92 [2,64-59,68]; DIAB: 122,34 [47,01-204,86]; DIAB-CKD: 29,14 [8,94-76,22] ml/perc, p = 0,070).

Az o-Tyr Fex érték a DIAB és a DIAB-CKD csoportban magasabb volt, mint a CONTR csoportban. A diabeteses csoportok Fex értéke meghaladta a 100 %-ot (6.2.3.2.1. táblázat). A kontroll csoportban az o-Tyr Fex értékét magasabbnak találtuk, mint a p-Tyr-ét (6.2.3.2.1. táblázat).

A vizelet-8-epi-prosztaglandin- $F_{2\alpha}$ /kreatinin hányados nem korrelált az o-Tyr clearance-szel és az o-Tyr Fex-el (r = 0,01 and r = - 0,167, p > 0,05 mindkét esetben).

6.3. Az oxidált fenilalanin-származékok és a katarakta (XX, XLI)6.3.1. Bevezetés

A szemlencse zavarossága, a katarakta a vakság leggyakoribb oka. A szemlencse sajátos szerv, amely avasculáris, magas fehérjetartalma ellenére a látható fény számára transzparens és a fehérjeturnover-e nagyon lassú (397). Éppen avasculáris és tokkal körülvett volta miatt zárt rendszert képvisel. A lassú fehérje-turnover miatt a környezeti hatások kumulálódnak a szemlencsében és a kor előrehaladtával opaleszcenssé válik (398). A kataraktogenezisben fontos szerepet játszik az ultraibolya fény, az ionizáló sugárzások, a gyógyszerek, a dohányzás és a diabetes mellitus (399-401), de a katarakta kifejlődésének pontos mechanizmusa még mindig ismeretlen. A szemlencse-fehérjéknek, mint pl. a krisztallinnak az irreverzibilis károsodása biztosan jelentőséggel bír. A glikáció, a karboniláció, keresztkötések képződése, a tiol csoportok oxidációja, aggregátumok képződése csökkenti a fehérjék vízoldékonyságát (402-404) és ez az opaleszcencia kifejlődéséhez vezethet.

Mint az előző részben említettük a hidroxil szabad gyök képződését követni lehet a tirozin izomerek (orto-tirozin, o-Tyr; meta-tirozin, m-Tyr) mérésével (405). További enzimatikus vagy hidroxil szabadgyökös lépésben 3,4-dihidroxi-fenilalanin (DOPA) képződik a p-Tyr-ből. Kataraktás lencsében a fehérjéhez kötötten képződő DOPA-t a hidroxil szabad gyök által okozott károsodás markerének tartják (406). A DOPA továbbalakulhat szabad gyök hatására DOPA-kinonná.

Cukorbetegségben a magas glukóz koncentráció oxidatív stresszt vált ki. Nem-diabeteses, egészséges egyénekben az öregedéshez társuló szabadgyök-termelés vesz részt a kataraktaképződésében (407).

Célkitűzésünk az volt, hogy nem-kataraktás, diabeteses kataraktás, és nem-diabeteses kataraktás lencsék oxidált Phe származékainak koncentrációját hasonlítsuk össze HPLC-eljárás felhasználásával.

6.3.2. Betegek és módszerek

6.3.2.1. Betegek

Keresztmetszeti vizsgálatunkban katarakta műtét során eltávolított lencséket analizáltunk a betegek írásbeli beleegyezése alapján. Mindegyik vizsgált lencsét ugyanaz a szemész operatőr távolította el. Kadaverekből származó lencsék képezték a kontroll csoportot. A tanulmányt a Pécsi Regionális Kutatás-Etikai Bizottság engedélyezte.

Három csoportot képeztünk: nem-kataraktás kontroll (CONTR), 2-es típusú diabeteses kataraktás (DM CAT) és nem-diabeteses (szenilis) kataraktás csoport (non-DM CAT) került kialakításra. A 2-es típusú diabeteszt az Amerikai Diabetes Társaság, American Diabetes Association (ADA) kritériumrendszere alapján diagnosztizáltuk. A CONTR és a DM CAT csoport átlag életkora nem különbözött, de a szenilis kataraktások (non-DM CAT) idősebbek voltak, mint a DM CAT és a CONTR csoport betegei. Ez nem meglepő, hiszen a szenilis katarakta idősebb korban alakul ki, mint a diabeteses katarakta. A csoportok főbb klinikai jellemzőit a 6.3.2.1. táblázat mutatja.
6.3.2.1.	táblázat A	csoporto	ok klini	kai j	jellemzői
----------	------------	----------	----------	-------	-----------

	CONTR	DM CAT	Non-DM CAT
Ν	17	22	20
Kor (év)	62 (48-73)	67 (64-78)	$75^{ab}(71-82)$
HbA_{1c} (%)	02 (40-73)	6,7 (6,4-7,6)	15 (11-62)
Fruktózamin (µmol/l)		272 (227-334)	
Éhomi plazmaglukóz (mmol/l)		8,1 (7,0-9,2)	

^a, p < 0.05 vs. CONTR; ^b, p < 0.05 vs. DM CAT; CONTR = kontroll csoport; DM CAT = 2-es típusú diabeteses kataraktás csoport; non-DM CAT = nem-diabeteses kataraktás csoport; HbA1c, hemoglobin A_{1c}. Az adatok mediánját és az (interkvartilis tartományt) adtuk meg.

6.3.2.2. Módszerek

6.3.2.2.1. Szemlencseminták előkészítése

A szemlencsék eltávolítása során nyert mintákat 30 percig 13 000 rpm-nél centrifugáltuk. A csapadékot Tris pufferben (pH 6,8) reszuszpendáltuk, ami 1 mmol/l EDTA-t és 4 mmol/l EGTA-t, valamint 0,2 mmol/l fenilmetánszulfonil fluoridot is tartalmazott. Ezután mind a kataraktás, mind a kontroll mintákat hasonlóképpen kezeltük és homogenizáltuk. A total homogenizátum fehérjetartalmát ismételt homogenizálás után Bradford módszere szerint határoztuk meg. A szemlencse vízoldékony (azaz fiziológiás) és nem vízoldékony (azaz károsodott) komponenseit centrifugálással választottuk el (13 000 rpm, 30 perc).

6.3.2.2.2. HPLC analízis

A mintaelőkészítés a következő volt: Jól záró polipropilén csövekbe 200 µl mintát, majd 4 µl 400 mmol/l-es dezferrioxamint (végkoncentráció: 3,6 mmol/l) és 40 µl 500 mmol/l-es butilált hidroxitoluént (végkoncentráció: 45 mmol/l) mértünk. Ez utóbbi két antioxidánst azért használtuk, hogy a fehérjehidrolízis során az artefaktképződést csökkentsük. Utána 200 µl 12 N-os sósavat mértünk be, majd egy éjszakán keresztül 120°C-on hidrolizáltuk a fehérjéket.

A DOPA-t ugyanúgy, mint a többi tirozin izomert 275 nm-es excitációnál és 305 nm-es emissziónál mértük.

6.3.2.2.3. Statisztika

Az SPSS 10.0-es verzióját (SPSS Inc., IE, USA) használtuk. Mivel az adatok többsége nemnormális eloszlású volt, az adatok mediánját és az interkvartilis tartományt adtuk meg. Ugyanezért a Kruskal-Wallis és a Mann-Whitney U-tesztet használtuk a csoportok összehasonlítására.

6.3.3. Eredmények

A teljes lencse homogenizátum fehérjetartalmát 1 mg/ml-re állítottuk. A lencse felülúszójának fehérje koncentrációja 1,45-2,50 mg/ml volt. Az aminosav koncentrációkat az oldat fehérjetartalmára

dc_360_181

korrigáltuk.

Az általunk használt HPLC módszerrel elvileg a DOPA, p-Tyr, m-Tyr, o-Tyr és a Phe koncentráció egyetlen futtatásból meghatározható. A p-Tyr koncentrációját mégsem mértük, mert koncentrációja hozzávetőlegesen három nagyságrenddel magasabb volt, mint a DOPA és az m-Tyr. Két reprezentatív kromatogrammot a 6.3.3.1. ábrán mutatunk.



6.3.3.1. ábra Diabeteses kataraktás beteg szemlencséjéből nyert teljes homogenizátumának (total homogenate, folytonos vonal, 1 mg/ml fehérje) és felülúszójának HPLC kromatogrammja (szaggatott vonal, 2.5 mg/ml fehérje). DOPA = 3,4-dihidroxi-fenilalanin; p-Tyr = para-tirozin; m-Tyr = meta-tirozin; o-Tyr = orto-tirozin; Phe = fenilalanin.

Az m-Tyr koncentrációja a felülúszó-minták túlnyomó többségében a detekciós küszöb alatt volt. Az m-Tyr kimutathatósága a felülúszóból, az adott fehérjekoncentráció mellett, magasabb volt a non-DM CAT esetében (18/22 minta, kimutatható/összes minta), mint a CONTR csoportban (7/17 minta), vagy a DM CAT csoportban (10/20 minta, Kruskall-Wallis teszttel p<0,05; Mann-Whitney U teszttel non-DM CAT vs. CONTR: p<0,05; non-DM CAT vs. DM CAT: p<0,05; chi²-teszttel: p<0,05). A teljes homogenizátumban a m-Tyr kimutathatósága a következőképpen alakult: DM CAT: 20/20 minta, non-DM CAT: 22/22 minta, CONTR: 11/17 minta. A statisztikai vizsgálatok eredményei a következők lettek: Kruskall-Wallis teszttel p<0,05; Mann-Whitney U teszttel DM CAT vs. CONTR:

p<0,05; non-DM CAT vs. CONTR: p<0,05. A teljes homogenizátum esetében a chi²-teszt matematikai okokból nem volt kivitelezhető, mert az elvárt cellánkénti esetszám túl alacsony volt. Az m-Tyr esetében a leíró és összehasonlító statisztikát azokra a mintákra végeztük el, amelyekben az m-Tyr kimutatható mennyiségben volt jelen. (6.3.3.1. táblázat).

		CONTR	DM CAT	Non-DM CAT
Felülúszó	DOPA/fehérje	413,56	305,53	188,61
	(nmol/g)	(79,01-1505,84)	(196,99-409,63)	(114,00-245,42)
	m-Tyr/fehérje*	1,06	3,20	2,46
	(nmol/g)	(0,77-3,01)	(1,22-4,74)	(1,54-4,47)
	o-Tyr/fehérje	30,96	22,43	18,66
	(nmol/g)	(3,39-37,08)	(7,82-87,99)	(11,17-121,84)
	Phe/fehérje	633	382	252 ^{a b}
	µmol/g	(299-819)	(332-512)	(197-306)
Teljes homogeni- zátum	DOPA/fehérje	1100,35	904,12 ^c	1346,23 ^c
	(nmol/g)	(289,34-1767,30)	(738,49-1287,17)	(428,44-738,49)
	m-Tyr/fehérje*	3,41 ^c	15,34 ^{a c}	20,28 ^{a c}
	(nmol/g)	(3,02-4,61)	(2,39-29,65)	(7,18-57,29)
	o-Tyr/fehérje	38,61	217,58 ^{a c}	211,78 ^{a c}
	(nmol/g)	(12,47-51,64)	(22,76-919,10)	(51,76-1128,03)
	Phe/fehérje	1102 ^c	1187 ^c	967 ^c
	µmol/g	(601-1246)	(956-1622)	(626-1336)

6.3.3.1. táblázat Szemlencsék felülúszójának és teljes homegenizátumának aminosav koncentrációi (fehérjére korrigálva)

^a, p<0,05 vs. CONTR; ^b, p<0,05 vs. DM CAT; ^c, p<0,05 vs. felülúszó; *: az m-Tyr számos mintában a kimutathatóság alatt volt, statisztikát azokból a mintákból készítettünk, amelyekben az m-Tyr kimutatható volt. CONTR = kontrollok; DM CAT = 2-es típusú cukorbetegek kataraktája; non-DM CAT = nem-diabetesesek kataraktája; DOPA = 3,4-dihidroxi-fenilalanin; m-Tyr = meta-tirozin; o-Tyr = orto-tirozin; Phe = fenilalanin. Az értékek mediánban és (interkvartilis tartományban) vannak megadva.

6.3.3.1. A kontroll- és a betegcsoportok összehasonlítása

Az aminosavak koncentrációját a minta fehérjetartalmára korrigált értékként fejeztük ki, pl DOPA/fehérje, m-Tyr/fehérje, o-Tyr/fehérje és Phe/fehérje.

A lencse felülúszójában a DOPA és az o-Tyr jól mérhető koncentrációban volt jelen, de az m-Tyr a minták egy jelentős részében az érzékenységi küszöb alatt volt. A három csoport összehasonlításából kiderült, hogy a DOPA/fehérje, az m-Tyr/fehérje és az o-Tyr/fehérje tekintetében nem volt különbség a felülúszóban. A DM CAT csoport Phe/fehérje hányadosa nem különbözött a CONTR-tól de a non-DM CAT csoport Phe/fehérje hányadosa alacsonyabb volt, mint a CONTR csoporté (6.3.3.1. táblázat).

A szemlencse teljes homogenizátumában a DOPA és az o-Tyr jól mérhető koncentrációban volt jelen. A CONTR minták teljes homogenizátumainak nagy részében az m-Tyr a mérési tartomány alatti volt, de a kataraktás mintákban jól lehetett mérni. Nem volt különbség a csoportok között a DOPA/fehérje hányados tekintetében, de az m-Tyr/fehérjét és az o-Tyr/fehérjét illetően a DM CAT és a non-DM CAT csoport értékei magasabbak voltak, mint a CONTR csoporté. A teljes homogenizátumban a Phe tartalmat illetően nem találtunk különbséget a csoportok között (6.3.3.1. táblázat).

A szemlencsék relatív Phe tartalmának jellemzésére bevezettük a Phe_{szup}/Phe_{teljes} hányadost, ahol a Phe_{szup} a felülúszó Phe koncentrációját (Phe/fehérje koncentráció formában) és a Phe_{teljes} a teljes homogenizátum Phe koncentrációját (szintén Phe/fehérje koncentráció formában) jelenti. Ennek a hányadosnak a mediánja a CONTR csoport esetében magasabb volt, mint a két betegcsoporté (6.3.3.1. ábra).



6.3.3.1. ábra A felülúszók relativ fenilalanin (Phe) tartalma az egyes csoportokban. p < 0.05 vs. CONTR mindkét csoportban. CONTR = kontroll, DM CAT = diabeteses kataraktás, non-DM CAT = nem-diabeteses kataraktás csoport.

6.3.3.2. A teljes homogenizátum és a felülúszó összehasonlítása

A csoportok összehasonlításán kívül elvégeztük a csoportokon belül a felülúszó-teljes homogenizátum összehasonlítását is. A CONTR, DM CAT és a non-DM CAT csoportok felülúszóját hasonlítottuk ugyanezen csoportok teljes homogenizátumához.

Azt találtuk, hogy a CONTR csoportban a felülúszó és a teljes homogenizátum nem különbözött egymástól a DOPA/fehérje hányados tekintetében, de a DM CAT és a non-DM CAT csoportban a DOPA/fehérje hányados magasabb volt a teljes homogenizátumban, mint a felülúszóban (6.3.3.1. táblázat).

A m-Tyr/fehérje hányadost minden csoportban magasabbnak találtuk a teljes homogenizátumban, mint a felülúszóban (6.3.3.1. táblázat).

dc 360 1^{8}

Az o-Tyr/fehérje hányados magasabbnak bizonyult a DM CAT és a non-DM CAT csoport teljes homogenizátumában, mint a felülúszójukban. A CONTR csoportban nem volt szignifikáns különbség (6.3.3.1. táblázat).

Mindhárom csoportban a teljes homogenizátum Phe/fehérje hányadosa magasabb volt, mint a felülúszóé. (6.3.3.1. táblázat).

6.4. Az oxidált fenilalanin-származékok az inzulin-rezisztencia lehetséges okai
6.4.1. Az orto- és meta-tirozin inzulin-rezisztenciát kelt zsírsejtekben
6.4.1.1. Bevezetés

Az inzulinnak a metabolikus hatáson (GLUT4 membrántranszlokáción) kívül, vazodilatátor (az NO-n keresztül), vazokonstriktor (az endotelin-1 (ET-1) expressziója révén) és mitogén (az ERK1/2-jelátvitelen át megvalósuló) hatása is van (6.4.1.1.1. ábra).



6.4.1.1.1. ábra Az inzulin intracelluláris jelátviteli irányai és azok hatásai (Muniyappa R és mtsai nyomán összeállítva, 408).

Az inzulin anyagcserehatása, a glukóz transzportja vonatkozásában, a GLUT-4 jelzésű glukóz transzporteren keresztül valósul meg. Inzulinhatásra ez az intracelluláris térben kompartmentalizált transzport fehérje kikerül a plazmamembránba, és ez a transzlokáció teszi lehetővé a glukóznak a vérből a sejtekbe jutását. Ez a mechanizmus elsősorban a vázizmokat, és a zsírsejteket jellemzi. A zsírsejtek anyagcserehatása nem merül ki a GLUT-4-en keresztüli glukózfelvételben, hanem fontosak a zsírok metabolizmusában is, sőt hormonálisan aktívak (pl. a mineralokortikoid releasing hormon itt képződik) illetve a citokinek (pl. adiponektin, TNF-alfa, stb) termelésének a helyei és ez által résztvesznek a szubklinikus gyulladás kialakulásában is. A szubklinikus gyulladás, a citokinek és a C-reaktív-proteinszint (CRP) révén a NAD(P)H-oxidáz enzim aktiválódásához és így szuperoxid szabad gyök termelődéséhez vezet (409,410). Az anyagcsere, az oxidatív stressz, a nem enzimatikus glikáció és a szubklinikus gyulladás között komplex interakció áll fenn. Fontos figyelembe venni azt is, hogy

az inzulin anyagcserehatásának kialakulásához rövid ideig fennálló, kiskoncentrációjú hidrogénperoxidra van szükség, amit az inzulin hatására aktiválódó NAD(P)H-oxidáz enzim termel (411). Így tehát az antioxidáns kezelés ronthatja is az inzulin jelátvitelt!

Az inzulin-rezisztencia hatására kialakuló hyperglykaemia növeli a nem enzimatikus glikációt, ami nem enzimatikus glikációs végtermékek (AGE-k) képződéséhez vezet, amelyek aktiválják az AGE receptorokat (RAGE), ami szintén NAD(P)H aktivációt okoz, ami aktiválja az NF-κB-t, ezáltal ez a nukleáris faktor a sejtmagban megindítja a citokinek expresszióját (lásd a nem enzimatikus glikációról szóló fejezetet).

Az oxidatív stressz során gyakran termelődő hidroxil szabad gyök, a már ismertetett módon *meta-* (m-Tyr) és *orto-*tirozin (o-Tyr) termelődést okoz.

A 3T3-L1 fibroblaszt sejtvonal speciális medium és kiegészítők hatására zsírsejtekké differenciálódik, amelyek széles körben kerülnek alkalmazásra a zsírszövet modellezése céljából.

Az inzulin-rezisztencia szelektív, csak az Akt (PKB) útvonalat érinti. Valószínűleg az oxidatív stressz hatására, a kaszkádban az Akt előtti inzulin-receptor szubsztrát-1-en (IRS-1) a normális tirozin foszforiláció helyett szerin foszforiláció jön létre 412,413). Feltételeztük, hogy a kóros tirozinok (meta-, orto-tirozin, m-Tyr és o-Tyr) képződésével és a jelátvivő fehérjékbe történő beépülésével zavar keletkezhet a normális jelátvitelben, ami inzulin-rezisztenciához vezethet.

6.4.1.2. Módszerek

6.4.1.2.1. Sejtkultúra

Az egér embrionális fibroblast primer kultúráját (3T3-L1) az ATCC-től (Manassas, US) rendeltük. A 3T3-L1 preadipocitákat Dulbecco's modified Eagle tápoldatban ((DMEM, Invitrogen, CAT number: 41966-029; Sigma Aldrich CAT number: D6046) tenyésztettük, amit kiegészítettünk 10% fötális marhaszérummal (FBS) (Gibco, CAT number: 16170-078), 100U/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml streptomycinnel (Gibco, CAT number: 15070-063) és 398 μM p-, m-, vagy o-Tyr-rel. A DMEM-ből használtunk 25 vagy 5 mM glukóz koncentrációjút is (a kísérlettől függően). A sejteket standard körülmények között, inkubátorban tenyésztettük. A sejt-differenciálódását elősegítendő az FBS-DMEM tápoldathoz 0,5 nM izobutil-metilxantint (Sigma Aldrich, CAT number: I 5879), 0,17 μM inzulint (Sigma Aldrich, CAT number: I 9278) és 250 nM dexametazont (Sigma Aldrich, CAT number: 861871) adtunk hozzá. A 4. naptól kezdve a sejteket DMEM /10%-os FBS tápoldatban tartottuk 0,17 μM inzulin jelenlétében, másnaponkénti tápoldatcserével, a kísérletek megkezdéséig. Miután a sejtek több mint 90%-a zsírsejtmorfológiát mutatott kezdtük el velük a kísérleteket. A kísérletek előtt a sejteket egy éjszakán keresztül FBS-mentes tápoldatban tartottuk.

6.4.1.2.2. Izotópjelzett glukózfelvétel

A sejteket glukóz mentes DMEM-ben (Gibco, Csertex, Hungary) inkubáltuk 30 percig, utána 2, 20, 200, 400 nmol/l inzulin jelenlétében 100 percig. Egyidejűleg 1 µCi/ml dezoxi-D-glukóz 2-[1 2-3H(N)] (3,7x104Bq/ml) (Izotóp Intézet, Hungary) is jelen volt az oldatban 100 percen keresztül. Utána a sejteket felkapartuk, majd lecentrifugáltuk 5 percig 1000 rpm-mel. Az üledékre 70 µl lízispuffert mértünk, majd 30 µl mintát mértünk szcintillációs számlálóban (Beckman LS 5000 TD, CPM-ben) 5 percen keresztül. A mintákat –70 °C fagyasztva tartottuk másnapig, amikor is a fehérjetartalmat mértük Hitachi spektrofotométerben. Az eredményeket a fehérjetennyiségre korrigáltuk.

6.4.1.2.3. HPLC-analízis

Az o-Tyr és az m-Tyr vizsgálatok a korábban leírtak szerint történtek.

6.4.1.2.4. Western blot analysis

A dohányfüst hatásáról szóló részben leírtaknak megfelelően végeztük az Akt (PKB)vizsgálatokat.

6.4.1.3. Eredmények

Mértük a 11 napon keresztül tenyésztett 3T3-L1 zsírsejtek izótópjelölt 2-dezoxi-D-glukóz felvételét. Az inzulin nélkül, csak p-Tyr jelenlétében tenyésztett sejtek glukózfelvételére normalizáltuk az értékeket. A p-Tyr és 5 mmol/L glukóz jelenlétében az inzulin növelte a zsírsejtek dezoxi-D-glukózfelvételét. A p-Tyr és magas (25 mM) glukóz jelenlétében az inzulin nem növelte a sejtek glukózfelvételét. Ehhez hasonlóan normális glukóz (5 mM) és o-Tyr vagy m-Tyr jelenlétében a sejtek glukózfelvételét az inzulin nem volt képes növelni. (6.4.1.3.1. ábra).

 dc_{360}^{189}



6.4.1.3.1. ábra A tápoldat glukóz-koncentrációjának és tirozin-összetételének hatása a 3T3-L1 zsírsejtek glukózfelvételére. Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg (n=5). *: p< 0,05 (ANOVA) †: p< 0,05 vs. p-Tyr és 5 mmol/L glukóz kontroll

Az m- és az o-Tyr eme inzulin-rezisztenciát kiváltó hatása koncentráció- és időfüggő volt (ábrán nem mutatott eredmények).

Az m- és o-Tyr inzulin-rezisztenciát kiváltó effektusának mechanizmusát keresve vizsgálatuk ezeknek a kóros aminosavaknak a hatását az inzulin glukometabolikus jelátviteléért felelős Akt (PKB) útvonalára. Az Akt (PKB) foszforiláltságát vizsgáltuk p-Tyr és normális glukózon (5 mmol/L), p-Tyr és magas glukózon (25 mmol/L), m-Tyr és o-Tyr és normális glukózon növesztett sejtek esetében. Az összehasonlításokat inzulin jelenlétében és hiányában is elvégeztük. Az eredményeket az Akt (PKB) relatív foszforiláltsága formájában adtuk meg (p-Akt/Akt) és normalizáltuk a p-Tyr kontroll sejtekre. Inzulin hiányában nem szignifikáns csökkenő tendenciát láttunk az m-Tyr és az o-Tyr esetében. Az inzulin (200 nmol/L) növelte az Akt foszforilációját 5 mmol/L-es glukóztartalmú tápoldatban. Az inzulin kiváltotta Akt-foszforiláció szignifikánsan kisebb volt a magas glukóz koncentrációjú (25 mmol/l-es), az m-Tyr és az o-Tyr tartalmú tápoldatban. Hasonló eredményeket kaptunk a 400 nmol/l-es inzulinkezelés esetében is (6.4.1.3.2. ábra).

 $dc_{360}181$



6.4.1.3.2. ábra Az Akt (PKB) foszforilációja 3T3-L1 sejtekben 5 és 25 mmol/L-es glukózkoncentráció és para-, meta- vagy orto-tirozin mellett inzulin nélkül és inzulin hatására. A relative foszforilációt (P-Akt/Akt) a kontroll százalékában fejeztük ki. Az adatok mediánját és 25-75 percentilis értékét adtuk meg (n=5). *: p < 0.05 (Kruskal Wallis és Mann-Whitney U teszt) †: p < 0.05 vs. p-Tyr és 5 mmol/L glukóz (Wilcoxon teszt) ‡: p < 0.05 vs. p-Tyr and 25 mmol/L glucose (Wilcoxon test with correction for multiple comparisons)

Igazoltuk azt is, hogy az m- és o-Tyr rövid időn belül transzportálódik a sejtekbe és ez a transzport független a glukóz koncentrációjától (5 vagy 25 mmol/l) az inzulin jelenlététől vagy hiányától. A 6.4.1.3.3. ábra A panelje az intracelluláris, fehérjéhez nem kötött, szabad m-Tyr felvételét mutatja az idő függvényében, a B panel ugyanezt ábrázolja az o-Tyr esetében.



6.4.1.3.3. ábra A meta-tirozin (A panel) és az orto-tirozin (B panel) akut felvétele 3T3-L1 sejtekbe az idő függvényeként, normális (5 mmol/l) vagy magas (25 mmol/l) glukóz és inzulin jelenlétében, vagy hiányában (átlag ± SEM, n=5).

A kóros aminosavak akut felvételén kívül vizsgáltuk azt is, hogy vajon beépülnek-e a sejt fehérjéibe. Eredményeink szerint a 11 napos sejttenyésztés során folyamatosan jelenlévő m-Tyr vagy o-Tyr beépül a sejtek fehérjéibe. A beépült p-Tyr, m-Tyr és o-Tyr mennyiségét a sejt össztirozinjának százalékában adtuk meg a következők szerint: p-Tyr/[(p-Tyr)+(m-Tyr)+(o-Tyr)], m-Tyr/[(p-Tyr)+(m-

Tyr)+(o-Tyr)], o-Tyr/[(p-Tyr)+(m-Tyr)+(o-Tyr)]. A beépülést 5 és 25 mmol/l-es glukózkoncentráció mellett is tanulmányoztuk. A sejtek p-Tyr tartalma szignifikánsan csökkent, akár o-Tyr, akár m-Tyr tartalmú médiumon nőttek (6.4.1.3.4. ábra A panel). A sejtfehérjék m-Tyr és o-Tyr tartalma szignifikánsan nőtt, ha a sejteket ezeknek az aminosavaknak a jelenlétében, akár 5 akár 25 mmol/l-es glukózkoncentráció mellett növesztettük (6.4.1.3.4. ábra B és C panel).





6.4.1.3.4. ábra HPLC mérés segítségével határoztuk meg a zsírsejtek fehérjéinek tirozin tartalmát (a para-, a meta- és az orto-tirozintartalmat az A, a B és a C panelen ábrázoltuk). A fehérjékbe beépült egyes tirozin izomerek százalékos arányát a fehérjék össztirozintartalmához képest adtuk meg. Az eredményeket átlag \pm SEM formában fejeztük ki (n=10). *: p<0,05 (ANOVA és posthoc analízis).

6.4.2. Az orto-tirozin inzulin-rezisztenciát kelt érfalban6.4.2.1. Bevezetés

Mint az előző fejezetben olvasható volt, az inzulinnak metabolikus hatásán kívül vaszkuláris effektusa is van, ami lehet vazodilatatív és -konstriktív is (414). Azt is láttuk, hogy az inzulin indukálta vazodilatáció az Akt-eNOS rendszer aktiváló foszforilációja révén valósul meg az NO-n keresztül (415,416). Amennyiben gátolták a PI3K rendszert (amely aktiválja az Akt-t) az inzulin vazokonstrikciót váltott ki, amit az extracelluláris szignal-regulálta kináz (ERK1/2) gátlója, a PD98059 blokkolt (414). Így tehát az inzulin kiváltotta vazokonstrikció az ERK1/2-n keresztül valósul meg. Arra is vannak adatok, hogy az inzulin indukálta vazokonstrikció részben a hidrogén-peroxidon (H₂O₂) keresztül valósul meg (417,418). A H₂O₂ vazodilatációt is okozhat, mégpedig a szolubilis guanilát cikláz (sGC) aktiválása révén (419,420). Mindezeket a hatásokat a H₂O₂-t bontó kataláz gátolja (421,422). Fontos azt is megjegyezni, hogy az ERK1/2 gátlói kivédik a H₂O₂ által okozott vazokonstrikciót, ami arra utal, hogy a H₂O₂ okozta vazokonstrikció az ERK1/2-n keresztül valósul meg (421,422).

Ebben a munkánkban feltételeztük, hogy az erek oxidáltsági állapota különböző és ennek megfelelően az inzulin kiváltotta vazodilatáció is eltérő. Ezt igazolandó vizsgáltuk a thoracális és az abdominális aortát és a femorális artériát. Az oxidáltsági állapotot tovább fokozandó akutan H₂O₂+aminotriazolt adtunk az izolált erekhez (az aminotriazol a kataláz enzim gátlója) (423,424), és az ellenkező irányú változást szuperoxid dizmutáz és kataláz (SOD+CAT) alkalmazásával váltottuk ki. Tanulmányoztuk az ERK1/2 jelátviteli útvonal szerepét is az inzulin indukálta vazomotor aktivitásban. Végül, feltételeztük, hogy az o-Tyr in vivo adagolása patkányoknak a kóros aminosav érfalba történő beépülése révén megváltoztatja az erek válaszképességét.

6.4.2.2. Módszerek

6.4.2.2.1. Állatok és kísérleti elrendezések

Felnőtt, 11-13 hetes, hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk a nem intervenciós vizsgálatainkban és 5-6 heteseket azokban, amelyek során a patkányokat szondázás révén vehikulummal, p-Tyr-rel és o-Tyr-rel szupplementáltuk. A szupplementációs vizsgálatok során 1,76 mg/die p-Tyr-t, vagy o-Tyr-t, illetve vehikulumot kaptak heti 6 napon keresztül, négy héten át. A szupplementálás során a patkányok közel megháromszorozták testsúlyukat, de a testsúlyban a csoportok (vehikulum, p-Tyr és o-Tyr) között nem volt különbség. A négyhetes szupplementációs kezelés után érfal tirozin összetétel (HPLC-s) és vazomotor (myographos) vizsgálatok történtek. A patkányok egy másik csoportjában a négy hetes kezelést négy hetes kezelés mentes, ún. kimosási periódus követte ("washout csoport"), és utána szintén HPLC-s és myographos vizsgálatokat

végeztünk. Végül a harmadik csoportban egyszeri szupplementáció után végeztük el a HPLC-s és myographos vizsgálatokat ("akut kezelési csoport").

6.4.2.2.2. Az érfal fenilalanin-, para-tirozin- és orto-tirozin tartalmának mérése

Az érszegmentumok (torakális-, abdominális aorta és femorális artéria) proximális részét hidrolizáltuk és a már ismertetett fluoreszcens detektálású HPLC-vel analizáltuk.

6.4.2.2.3. Vazomotor vizsgálatok myograph-fal

A dohányzással kapcsolatos részben leírt módszert alkalmaztuk. Az ereket 100 nM epinefrinnel prekontraháltuk.

6.4.2.2.4. Statisztika

Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. ANOVA-t, és ahol szükséges volt nem paraméteres teszteket használtunk.

6.4.2.3. Eredmények

6.4.2.3.1. Az erek falának orto-tirozin tartalma kezeletlen állatokban

A legmagasabb érfali o-Tyr-tartalmat a torakális aortában mértük, ezt követte az abdominális aorta és a legalacsonyabbnak a femorális artéria értéke bizonyult, azaz a periféria felé csökkenő tendenciát észleltünk (6.4.2.3.1.1. ábra A panel). Akut H₂O₂+aminotriazol (AT) hatásra az o-Tyr tartalom csak a torakális aortában nőtt szignifikánsan (6.4.2.3.1.1. ábra B panel). Superoxid dizmutáz és kataláz (SOD+CAT) hatására az o-Tyr mennyisége szignifikánsan csökkent ugyan a torakális aortában és a femorális artériában, de az abdominális ortában nem változott (6.4.2.3.1.1. ábra B panel) és a torakális aortában a csökkenés nem haladta meg a 20%-ot.

dc_360_191



6.4.2.3.1.1. ábra A panel: A nem szupplementált patkányok érfalainak orto-tirozin (o-Tyr) tartalma. Szignifikáns volt a különbség (*: p<0,05) a torakális (n=7), az abdominális aorta (n=7) és a femorális artéria (n=9) között. **B panel:** Az érfali o-Tyr-szintek akut változásai H₂O₂+AT (oxidatív stresszt növelő) és SOD+CAT (oxidatív stresszt csökkentő) kezelés hatására. H₂O₂+AT: hidrogén-peroxid + aminotriazol [torakális: n=5; abdominális: n=5; femorális: n=4]; SOD+CAT: szuperoxid dizmutáz + kataláz [torakális: n=5; abdominális: n=5; femorális: n=5]. Az adatok átlag ± SEM formában kerültek megadásra. Az o-Tyr-szinteket fenilalaninra (Phe) korrigálva adtuk meg (A és B panel) és a kontroll százalékában fejeztük ki (B panel). *: p < 0,05; NS: p > 0,05 (ANOVA).

6.4.2.3.2. Érszegmentumok vazomotor válasza inzulinra, a nem szupplementált állatokban

Jelentős különbség volt kimutatható az erek inzulinra adott vazomotor válasza között. A legjobban a femorális artéria relaxált inzulinra, a legkevésbé a torakális aorta (6.4.2.3.2.1. ábra).

dc_360_191



6.4.2.3.2.1. ábra Az inzulin dózis-hatás görbéje nem szupplementált patkányok három vizsgált erén. Az inzulin a femorális artérián volt a leghatékonyabb (n=7), kevésbé hatékonynak bizonyult az abdominális (n=7) és a legkevésbé hatékonynak a torakális aortán (n=7). A relaxációt az inzulindózis logaritmusa függvényében ábrázoltuk. Az adatok átlag \pm SEM formában jelennek meg. *: p < 0,05; NS: p > 0,05 (Extra sum-of-squares F test).

6.4.2.3.3. Érszegmentumok vazoaktivitásának vizsgálata acetilkolinnal, a nem szupplementált patkányokban

Vizsgáltuk az o-Tyr hatását az acetilkolin által kiváltott vazoaktivitásra is és, az inzulinhoz hasonlóan, azt tapasztaltuk, hogy a magasabb o-Tyr tartalmú erekben az acetilkolin vazorelaxáló képessége kisebb volt, mint ott ahol az o-Tyr tartalom alacsonyabbnak bizonyult (ábrán nem mutatott eredmények).

6.4.2.3.4. Az oxidatív stressz SOD+CAT-tal és H_2O_2 +AT-vel történő akut befolyásolásának hatása nem szupplementált patkányok ereinek vazomotor aktivitására

A torakális aorta inzulin kiváltotta relaxációját a SOD+CAT elősegítette, az abdominális aortáét nem befolyásolta és a femorális artériáét csökkentette (6.4.2.3.4.1. ábra). A torakális aorta válaszkészsége inzulinra azonban még az akut SOD+CAT kezelést követően sem érte el a femorális artériáét.



6.4.2.3.4.1. ábra A szuperoxid dizmutáz + kataláz (SOD+CAT) kezelés hatása az inzulin által kiváltott vazorelaxációra a három vizsgált éren. Míg a SOD+CAT kezelés növelte az inzulin hatását a torakális aortán, addig a femorális éren csökkentette azt. Az abdominális aortaszakaszon hatástalan volt. Az inzulin+SOD+CAT hatása a torakális aortán nem érte el a femorálison kifejtettet [a 2. és az 5. oszlop között szignifikáns maradt a különbség]. Az inzulin EC₅₀-jének logaritmusát (logEC₅₀) ábrázoltuk; inzulin-kezelés: torakális: n=7, abdominális: n=7, femorális: n=7; inzulin+SOD+CAT-kezelés: torakális: n=6, abdominális: n=6, femorális: n=7. A nullához közelebbi értékek magasabb inzulinigényt, azaz inzulin-rezisztenciát jeleznek. Az adatok átlagát ± SEM-et adtunk meg. *: p < 0,05; NS: p > 0,05 (Extra sum-of-squares F test).

A H_2O_2 +AT-kezelés szignifikánsan csökkentette a torakális aorta inzulin által kiváltott relaxációját, de nem befolyásolta az abdominális aortáét és növelte a femorális artériáét (6.4.2.3.4.2. ábra).



6.4.2.3.4.2. ábra A hidrogén-peroxid + aminotriazol (H_2O_2+AT) és az ERK-gátló (PD, PD98059) előkezelés hatása az inzulin indukálta vazorelaxációra nem szupplementált patkányok erei esetében. A H_2O_2+AT előkezelés csökkentette az inzulin kiváltotta vazorelaxációt a torakális aortában, nem befolyásolta az abdominálisban és növelte a femorális artériában. A torakális aortában az ERK1/2-gátló PD98059 kivédte a H_2O_2+AT által kiváltott hatást. Metodikai okok miatt a PD98059 hatását nem tudtuk vizsgálni a femorális artériában. Inzulin-kezelés: torakális aorta: n=7, abdominális: n=7, femorális: n=7; inzulin+ H_2O_2+AT -kezelés: torakális: n=4, abdominális: n=5, femorális: n=6; inzulin+ $H_2O_2+AT+PD$ -kezelés: torakális: n=6, abdominális: n=4. Az adatokat átlag ± SEM formában adjuk meg. *: p < 0,05; NS: p > 0,05 (Extra sum-of-squares F test).

6.4.2.3.5. Az inzulin által kiváltott vazomotor-aktivitás befolyásolása ERK1/2 gátlóval, nem szupplementált patkányokban

Annak vizsgálatára, hogy az ERK1/2 vajon részt vesz-e az inzulin vazoaktivitásának oxidatív módosításában az ERK1/2-gátló PD98059-t (PD; 10 μ M, 30 perc) használtuk. Azt találtuk, hogy a torakális aortában a PD98059 teljesen kivédte a H₂O₂+AT által kiváltott csökkenését az inzulin indukálta vazoaktivitásnak (6.4.2.3.4.2. ábra). Az abdominális aortában a H₂O₂+AT-nak nem volt szignifikáns hatása. A PD98059 teljesen meggátolta a femorális artériában az epinefrin kiváltotta vazokonstrikció kialakulását, ezért ebben az érben nem volt használható a H₂O₂+AT hatásának modulálására.

6.4.2.3.6. A H_2O_2+AT vazomotor hatása az ERK1/2 jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg nem szupplementált patkányokban

Inzulinmentes oldatban, a H_2O_2+AT átmeneti vazokonstrikciót váltott ki (6.4.2.3.6.1. ábra). A legnagyobb vazokonstrikció a torakális aortában alakult ki H_2O_2+AT hatására, kisebb volt az effektus az abdominális aortában és a legkisebb a femorális artériában (6.4.2.3.6.1. ábra A, B és C panele). Az

ERK1/2-gátló PD98059 koncentráció-függően kivédte a H_2O_2+AT indukálta vazokonstrikciót mind a három érben (6.4.2.3.6.1. ábra D panel).



6.4.2.3.6.1. ábra A hydrogen-peroxid + aminotriazol (H₂O₂+AT) és az ERK1/2 gátló (PD, PD98059) vazomotor hatása a három érben nem szupplementált patkányokban. Az eredeti regisztrátumok mutatják a H₂O₂+AT kiváltotta átmeneti vazokonstrikciókat **A**) a torakális (legnagyobb válasz), **B**) az abdominális aortában (kisebb válasz) és **C**) a femorális artériában (gyenge válasz). **D**) Az adatok összesített oszlopdiagrammja szerint a 10 μ M és az 50 μ M PD98059 meggátolta a H₂O₂+AT által kiváltott vazokonstrikciót. H₂O₂+AT = hydrogen-peroxid + aminotriazol, torakális: n=19, abdominális: n=19, femorális: n=24; H₂O₂+AT+PD(10): hidrogén-peroxid + aminotriazol inkubációt megelőző 10 μ M-os PD98059-es előinkubáció torakális: n=6, abdominális: n=5, femorális: n=4; H₂O₂+AT+PD(50): hidrogén-peroxid + aminotriazol inkubációt megelőző 50 μ M-os PD98059-es előinkubáció torakális: n=4, abdominális: n=4. Az adatok átlagát ± SEM-et adtuk meg. *: p < 0,05; NS: p > 0,05; †: p < 0,05 vs. H₂O₂+AT torakális aorta; ‡: p < 0,05 vs. H₂O₂+AT femorális artéria (Extra sum-of-squares F test).

6.4.2.3.7. A krónikus orális o-Tyr-szupplementáció hatása az érfal o-Tyr tartalmára és az erek relaxációjára

Egy hónapos orális p-Tyr, o-Tyr, vagy vehikulum kezelése után megmértük a patkányok ereinek o-Tyr-tartalmát és vazorelaxációs képességét (6.4.2.3.7.1. ábra A panel). Az o-Tyr-

szupplementáció szignifikánsan növelte az erek o-Tyr-tartalmát (6.4.2.3.7.1. ábra B panel). A kezelési periódus 4 hetét követte a kimosási periódus 4 hete, amely után a 8. héten a patkányok egy másik csoportjában megmértük az erek o-Tyr tartalmát és attól függetlenül, hogy melyik csoport kapott az első 4 hét során vehikulumot, p-Tyr-t, vagy o-Tyrt nem találtunk a tirozin kezelésnek megfelelő különbséget (ábrán nem mutatott eredmények).

Megvizsgáltuk azt is, hogy az oTyr egy hónapos perorális *in vivo* szupplementációja hogyan befolyásolta az erek *ex vivo* inzulin indukálta relaxációját. Szignifikánsan csökkent az abdominális aorta és a femorális artéria inzulin által kiváltott relaxációja (6.4.2.3.7.1. ábra C panel). A torakális aortában az o-Tyr-szupplementáció nem rontotta az inzulin indukálta relaxációt, de a p-Tyr-szupplementáció javította azt (6.4.2.3.7.1. ábra C panel).

A kezelési periódus 4 hetét követte a kimosási periódus 4 hete, amely után a 8. héten a patkányok egy másik csoportjában megismételtük a vazomotor vizsgálatokat, és azt találtuk, hogy az erek relaxációs képessége egyforma volt, attól függetlenül, hogy melyik csoport kapott az első 4 hét során vehikulumot, p-Tyr-t, vagy o-Tyrt (ábrán nem mutatott eredmények).



6.4.2.3.7.1. ábra A) A kísérleti protokoll szerkezete a szupplementációs vizsgálatok során. A patkányokat, szondán keresztül, 4 héten át orálisan vehikulummal, para-tirozinnal (p-Tyr), vagy orto-tirozinnal (o-Tyr) szupplementáltuk, amit fiziológiás sóoldatban oldottunk. A négy hét letelte után az állatok egy részéből ereket preparáltunk vizsgálatokra, másik részük egy következő négy hetes 'washout' után került vizsgálatra a 8. héten. B) A tirozin izomerek szupplementáció hatására mindhárom érfal o-Tyr tartalmára (a 4. héten). Az orális o-Tyr-szupplementáció (p-Tyr) nem befolyásolta az érfal tirozintartalmát a vehikulummal kezelt kontroll (Control) állatokhoz képest. Control: torakális: n=4, abdominális: n=4; femorális: n=4; p-Tyr-szupplementáció: torakális: n=4, abdominális: n=4, femorális: n=4, femor

relaxációjára (a 4. héten). A p-Tyr-szupplementáció nem befolyásolta a relaxációt a vehikulum kezeléshez képest. Az o-Tyr-szupplementáció viszont mindhárom érben csökkentette a relaxációt a p-Tyr csoporthoz képest, és az abdominális aortában, illetve a femorális artériában a vehikulummal kezelt csoporthoz (Control) képest is. Control: torakális: n=4, abdominális: n=4, femorális: n=4; p-Tyr-szupplementáció: torakális: n=4, abdominális: n=4, femorális: n=4; o-Tyr-szupplementáció: torakális: n=4 femorális: n=4. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *: p < 0,05; NS: p > 0,05; Panel B: (ANOVA); Panel C: #: p < 0,05 vs. Para (Extra sum-of-squares F test).

6.4.2.3.8. Akut orális o-Tyr-szupplementáció hatása az érfal vazorelaxációjára

A patkányok akut, 30 perces p-Tyr, o-Tyr vagy vehikulum kezelése nem befolyásolta az érszegmentumok vazorelaxációs képességét (ábrán nem mutatott eredmények).

6.5. Megbeszélés

Oxidált aminosavakkal foglalkozó első tanulmányunkban, keresztmetszeti vizsgálatban mértük a vizelet és plazma p- és o-Tyr koncentrációkat diabetes mellitusban és veseelégtelenségben. Igazoltuk, hogy az általunk alkalmazott módszer alkalmas a vizelet és a plazma nem-fehérjéhez kötött p- és o-Tyr meghatározására. Az általunk mért plazma-p-Tyr-, -o-Tyr- és -Phe-szint jó megegyezést mutatott az irodalmi adatokkal. Ishimitsu és mtsai. ugyanezt a módszert használva, az adatok átlagát megadva a p-, o-Tyr és a Phe szérum-koncentrációit 52 µmol/l-nek, 17 nmol/l-nek és 58 µmol/l-nek találták egészséges önkéntesekben (425) Saját CONTR csoportunk mediánjai a következők voltak: 56 µmol/l (p-Tyr), 22 nmol/l (o-Tyr), 40 µmol/l (Phe).

Korábbi állatkísérletek (426) arra utaltak, hogy intraperitoneális vagy intramuszkuláris Phe adása után 15 perccel érte el a maximumát a szabad o-Tyr képződése. Ezért feltehetően a szabad o-Tyr koncentráció-változásai a gyors szabadgyökös folyamatokat tükrözik. A fehérjéhez kötött o-Tyr metabolizmusa sokkal lassabb lehet. Irodalmi adatok szerint a nem-fehérjéhez kötött, szabad o-Tyr koncentrációja 4,03-szor magasabb, mint a fehérjéhez kötötté (427). Vizsgálatunk fő célkitűzése a p-Tyr és az o-Tyr vese-metabolizmusának megismerése volt. A vese clearance és a Fex méréséhez a szabad, nem-fehérjéhez kötött p-Tyr-t és o-Tyr-t kellett mérnünk.

Urémiában károsodik az aminosav metabolizmus (428,429). Urémiában és már azotémiában is alacsonyabb plazma-p-Tyr-koncentrációt találtak, mint az egészséges kontroll egyénekben (CKD vs. kontrollok: 26 vs. 46 μ mol/l (430) és 27 vs. 54 μ mol/l (431). A mi megfelelő adataink 28 vs. 56 μ mol/l voltak. Találtunk arra utaló irodalmi adatot, amely szerint veseelégtelenségben csökken a fenilalanin hidroxiláz enzim aktivitása (432). Vizsgálatainkban a p-Tyr Fex értéke 100 % alatt volt (az összes csoportra érvényes tartomány: 0,24 – 20,67 %). Eszerint a p-Tyr-t a vese hatékonyan retineálja. A p-Tyr csökkent szintézisére utal, hogy a CKD betegeknek csökkent a plazma-p-Tyr szintje, miközben a Fex értékük hasonló, mint a CONTR csoporté.

A diabetes mellitus és az urémia szövődményeinek kialakulásában fontos szerepet játszik a szabadgyökös károsodás (433). Ezért figyelemre méltóak a szabadgyökös károsodás jól detektálható

és stabil markerei. Az oxidatív stressz-markerek közül az F_2 -izoprosztánok specifikusak a lipidperoxidációra, sajnos azonban a minta tárolása és kezelése során artefaktként is képződnek (434). Az o-Tyr viszont specifikus a hidroxil szabad gyök okozta Phe-hidroxilációra. A vizelet 8-epiprosztaglandin- $F_{2\alpha}$ /kreatinin hányados nem korrelált az o-Tyr exkrécióval, aminek a két molekula különböző eredete lehet az oka. Az m-, az o-Tyr és a ditirozin ma elfogadott specifikus markere a hidroxil szabad gyöknek (432-435). Vizsgálataink során bizonyítást nyert, hogy a hidroxil szabad gyök-marker o-Tyr vizeletexkrécióját illetően a diabetes mellitus és a veseelégtelenség additív hatású.

A Phe nagyobb koncentrációban fordul elő a plazmában, mint az o-Tyr (27,52 µmol/l a Phe és 0,05 µmol/l az o-Tyr koncentrációja a CKD csoportban), ami valószínűtlenné teszi azt, hogy a Phe-koncentráció változása befolyásolná az o-Tyr képződését (nem rate-limiting a Phe).

Az, hogy a plazma és a vizelet o-Tyr tartalma nem korrelált egymással arra utal, hogy a vizelet o-Tyr kiválasztását nem egyedül a GFR határozza meg, hanem a vesében lejátszódó folyamatok is determinálják. Eredményeink szerint az o-Tyr vesében zajló metabolizmusa különböző betegségekben más és más. Az o-Tyr Fex-e 100% feletti volt a diabeteses csoportokban. A 100% feletti Fex értéknek a hátterében két folyamat állhat: vagy aktív tubuláris szekréció vagy az anyag *in loco* a vesében történő termelése. Eredményeink alapján nem tudjuk megmondani, hogy a kettő közül melyik valósult meg. Diabetes mellitusban a vizeletglukóz koncentrációja elérheti a 100-200 mmol/l-t is (saját, nem közölt adat). A tubuláris sejtekben glukóz indukálta oxidatív stressz alakulhat ki, ami növelheti az o-Tyr termelést és így diabetesesekben 100% fölé emelkedhet az o-Tyr Fex értéke.

Eredményeink szerint a fiziológiás p-Tyr-t a vese sokkal (a kontrollokban hozzávetőlegesen tízszer, a diabetesesekben több mint százszor) hatékonyabban tartja vissza, mint a kóros o-Tyr-t (lásd 3.3.2. táblázat adatait). Ezek szerint a vese megfelelő transzport rendszerei különbséget tesznek az oés a p-Tyr közötti minimális eltérés alapján a két aminosav között. Ez akár egy alkalmazkodási folyamat része is lehet, hiszen a szervezet számára fontos hormon-előanyagot és fehérje építőelemet jelentő p-Tyr-t visszatartja és a kóros o-Tyr-t nagyobb mértékben eliminálja.

A fehérjékbe beépülő vagy ott in situ a Phe-ből képződő o- és m-Tyr turnover-e általában lassú. Különösen lassú olyan fehérjék esetében, mint pl. a szemlencse fehérjéi. Ezért a szemlencse fehérjéi mintegy összegyűjtik az egészséges vagy a diabeteses beteg fehérjéit károsító eseményeket. Éppen ezért a szemlencse természetes öregedéséhez képest a diabeteses károsodást akár felgyorsult öregedésként is felfoghatjuk. Ez látszott azokból az eredményeinkből is, amelyek szerint ugyanaz a károsodás, ami a katarakta képződéséhez vezet, diabeteses betegekben fiatalabb korban jelentkezik, mint az ún. szenilis kataraktában.

A fiziológiásnak nevezett öregedés során nem csak a fehérje struktúrája változik meg az által, hogy az oxidált Phe származékok felszaporodnak bennük, hanem ennek következtében a fehérjefehérje, a fehérje-víz és a fehérje-ion kölcsönhatások is módosulnak. Amíg a lencse kompenzáló mechanizmusai elégségesek, a lencse transzparens marad. A transzparencia elvesztése ezeknek a védő

mechanizmusoknak a kimerülését jelzi. A védőmechanizmusoknak fontos szereplői az alacsony molekulasúlyú ún. chaperon fehérjék, az ATP, és a citoszkeletális fehérje rendszer (437). A lencse magas fehérjetartalma szoros kapcsolatban van a vízzel.

Az általunk használt HPLC-eljárás alkalmas volt arra, hogy Phe-t, DOPA-t és o-Tyr-t mutassunk ki kontroll és kataraktás lencsékből. Az m-Tyr nem minden mintában volt kimutatható. Elsősorban a kontroll és a felülúszó mintákban észleltünk a kimutathatóság alatti koncentrációt. Ismert (438) és saját, korábbi, nem-közölt in vitro vizsgálatainkban is igazolódott, hogy hidroxil szabadgyök-képző rendszerben az o- és a m-Tyr egyenlő mennyiségben képződik. Mégis in vivo jelenlétük nagyon is különbözhet. Az o-Tyr koncentrációja akár tízszerese is lehet az m-Tyr-ének (438), amit saját eredményeink is megerősítenek (3.3.2. táblázat). Ennek a különböségnek az oka nem ismert.

Általánosan elfogadott, sőt ajánlott az oxidált aminosav-származékokat a kiindulási aminosavra korrigálni (esetünkben a Phe-re, 438). Vizsgálatainkban azonban jelentős Phe-tartalom különbségeket figyeltünk meg a felülúszóban, a kataraktás lencsékben a kontrollhoz képest, illetve a felülúszóban a teljes homogenizátumhoz képest. Ha oxidált aminosav/Phe hányadossal számolnánk, akkor az eredményeket nagymértékben befolyásolnák a Phe koncentráció különbségei, ezért az o-Tyr/Phe helyett mi az o-Tyr/fehérjét használtuk. Az irodalmi összehasonlíthatóság kedvéért megadjuk az o-Tyr/Phe hányadost is a teljes homogenizátumra: nálunk a kontroll vs. szenilis katarakta 0,034 vs. 0,69 nmol o-Tyr/µmol Phe volt, ami jó egyezést mutat az irodalmi eredményekkel, amelyek 0,18 vs. 0,65 nmol o-Tyr/µmol Phe (439) és 0,5 vs. 1,8 nmol o-Tyr/µmol Phe (438) voltak.

Azt tapasztaltuk, hogy az oxidált aminosav származékok a kataraktás szemlencsék teljes homogenizátumában akkumulálódtak, és a kataraktás lencsék felülúszójában nem nőtt a koncentrációjuk. Tehát az oxidatív stressz termékek a nem vízoldékony fázisban szaporodtak fel.

A Phe/fehérje hányadost a Phe oxidáció miatti fogyása csak mintegy 0,1-0,01 %-ban befolyásolhatta, míg a DM CAT és a non-DM CAT mintákban a Phe-fogyás mértéke 40-60%-os volt (3.3.2. táblázat). A felülúszó és a teljes homogenizátum, valamint a kontroll és a kataraktás felülúszó Phe tartalmának különbsége azért sem adódhatott a Phe oxidációs fogyásából, mert a Phe és az o-valamint m-Tyr koncentráció között 3-4 nagyságrendbeli különbség van (Phe vs. m-Tyr és o-Tyr, hozzávetőlegesen 1000 µmol/g vs. 20 nmol/g és 200 nmol/g, 3.3.2. táblázat). Továbbá alacsonyabb Phe/fehérje hányadost mértünk a kataraktás, mint a kontroll felülúszóban anélkül, hogy az oxidált aminosavak koncentrációja növekedett volna. Ez is azt támasztja alá, hogy a Phe csökkenése nem az oxidációból fakad. Összefoglalva ezeket az adatokat arra a következtetésre juthatunk, hogy a Phe tartalom csökkenése azt bizonyítja, hogy más a fehérjeösszetétele a kataraktás vízoldékony frakciónak. A felülúszó/teljes homogenizátum Phe-hányados eredménye arra utal, hogy a felülúszó és a teljes homogenizátum fehérje összetétele is különböző, amire irodalmi adatok is vannak (278).

A lencse fontos fehérjealkotói a krisztallinok, amik fontos szerepet játszanak abban, hogy a magas fehérjetartalom ellenére a lencse a fény számára transzparens marad. A szemlencse m- és o-Tyr

tartalmának vizsgálata több szempontból is fontos lehet:

1. Mert az oxidált Phe származékok jól jelzik a hidroxil szabadgyökös hatást.

2. Az m-Tyr oldhatósága kisebb, mint a p-Tyr-é, és az o-Tyr oldhatósága a legkisebb, sorrendben a tirozinok oldhatósága: p-Tyr>m-Tyr>o-Tyr.

3. Az m- és az o-Tyr akkumulációja parallel halad a fehérjék tiol csoportjainak oxidációjával, glikoxidációjával és a keresztkötések kialakulásával is (432), amelyek szerepet játszanak a lencsefehérjék oldhatóságának csökkenésében.

4. Az m- és az o-Tyr mérése azért is fontos lehet, mert markerei a Phe oxidációjának, és a Phe intakt volta kulcsfontosságú a krisztallinok chaperon funkciójához (441,442). A hidroxil szabad gyök által okozott szelektív módosítása a kulcspozícióban lévő Phe-nek a krisztallin chaperon funkciójának elvesztéséhez, a fehérje szolubilitásának csökkenéséhez és ez által a katarakta képződéséhez vezethet.

Szemlencsék fehérjéin végzett vizsgálataink szerint az oxidált aminosavak a lencsék nemvízoldékony frakciójában akkumulálódnak és ennek, a kulcspozícióban lévő Phe elvesztése révén, szerepe lehet a katarakta kifejlődésében.

A zsírsejteken és az ereken, a kóros aminosavakkal kapcsolatban végzett vizsgálatok együttes megbeszélése

Ezeknek a vizsgálatainknak a következő főbb eredményei emelhetők ki:

1.Az orto- és meta-tirozinon növesztett zsírsejtek – a 25 mmol/l glukózon neveltekhez hasonlóan – inzulin-rezisztensekké váltak.

2.Az inzulin jelátvitelében kulcsszerepet játszó Akt aktiváló foszforilációja orto- és meta-tirozin hatására ugyanúgy csökkent, mint a 25 mmol/l-es glukóztartalmú médiumban.

3.Az orto- és metatirozinon nevelt zsírsejtek a kóros aminosavakat a tápoldat glukóz- és inzulintartalmától függetlenül felvették és az intracelluláris fehérjékbe beépítették.

4.Az oxidatív stressz mértéke a perifériás erek felé csökken, ami befolyásolja az erek vazodilatációs készségét inzulinra és acetilkolinra.

5.Az oxidative stressz növekedésével az ERK1/2 útvonal aktiválódik, ami az inzulin-hatás csökkenésével jár együtt.

6.A femorális artériában, ahol a legkisebb az oxidatív stressz az inzulin hidrogén-peroxidon keresztül vazorelaxációt okoz.

7.Az oxidatív stresszt akutan növelve (hidrogén-peroxid+aminotriazollal) vagy csökkentve (szuperoxid dizmutáz+katalázzal, SOD+CAT) az erek vazoaktivitását mérsékelten tudjuk csak befolyásolni.

8. A hidroxil szabad gyök okozta oxidatív stressz végterméke, az orto-tirozin önmagában is befolyásolhatja az erek vazorelaxációját, csökkentve azt, ugyanis oxidatív stressz nélkül, orto-tirozin etetése révén is ki tudtuk váltani a hatást.

Az eredmények alapján, az alábbi ábrán (6.5.1. ábra) mutatjuk be az orto- és meta-tirozin patomechanizmusát:



6.5.1. ábra. Az orto-tirozin feltételezett szerepe az inzulin-rezisztencia kialakulásában. Akár exogén (pl. táplálék), akár endogén (oxidatív stressz-betegség) forrásból ered a szervezet orto-tirozin tartalmának emelkedése, a magasabb orto-tirozin szint miatt a kóros aminosav nagyobb arányban épül be a fehérjékbe. Ugyanakkor a meglévő fehérjék fenilalaninja is módosulhat orto-, para-, vagy meta-tirozinra. A meta-, de különösen az orto-tirozin vízoldékonysága sokkal rosszabb, mint a fenilalaniné, vagy a para-tiroziné, ezért fehérjekonformáció-változás következhet be. Másrészt, a kóros tirozinok beépülhetnek a jelátvivő fehérjékbe és így megváltoztathatják a tirozinfoszforilációt. Mindkét esetben csökken az inzulin kiváltotta jelátvitel és inzulin-rezisztencia alakulhat ki.

Az oxidatív stressz inzulin-jelátvitelt befolyásoló szerepe jól ismert zsírsejtekben (410) és a diabeteses Zucker patkányok vazomotor-károsodását a szabadgyök-termelés növekedésével magyarázták (443).

Klinikai tanulmányokból (444-448) tudjuk, hogy 2-es típusú cukorbetegségben a betegek 1-2 hetes intenzív inzulinkezelése (Pen-nel, vagy inzulinpumpával) hosszútávú előnyökkel járhat. A betegek inzulin-rezisztenciája jelentősen, némely közleményben HOMA_{IR}-rel követve a felére is csökkenhet. Valószínűleg ennek hatására, a béta-sejtek átmeneti tehermentesítésének következtében, az endogén inzulintermelés is sokat javul. Ez a kedvező állapot (csökkent inzulin-rezisztencia és jobb inzulintermelés) akár még egy év múlva is fennállhat úgy, hogy a betegek csak diétát tartanak és egyéb antidiabetikus kezelésben nem részesülnek. Ezt a jelenséget áttörési jelenségnek hívjuk. Az ellenkező előjelű folyamat is ismert, amennyiben kiderült, hogy saját, zsírsejtekkel végzett vizsgálataink szerint az orto- és a meta-tirozin hatásának kialakulásához, nagy dózis esetén is legkevesebb 2 nap szükséges (ábrán nem mutatott eredményeink).

Az áttörés kiváltásához tehát nem elégséges egy akut hatás, és nem szükséges krónikus beavatkozás. Alapkutatási adatok szerint a szubakut oxidatív stressz, a JNK útvonalon keresztül, az inzulin jelátviteléhez szükséges IRS-1 gátló, szerin-foszforilációját váltja ki. A szubakut beavatkozás, amit a klinikumban az áttöréskor végzünk, tartós következményekkel jár, és nem lehet akut antioxidáns effektus és nem lehet olyan sem, ami az epigenetikus elváltozásokat normalizálja, tehát hátterében leginkább a fehérje-elváltozások megfordítása állhat.

Koncentráció-függést mutató, orto- és meta-tirozinnal végzett zsírsejt-vizsgálataink szerint (ábrán nem mutatott eredmények) a para-tirozinnak legkevesebb 32-szeres koncentrációban kell jelen lennie a tápoldatban ahhoz, hogy csökkenteni tudja az orto- és a meta-tirozin inzulin-rezisztenciát okozó hatását. Ez kompetícióra utalhat és felveti terápiás meggondolások lehetőségét is.

Vaszkuláris viszgálataink szerint az oxidatív stressz markerének, az orto-tirozinnak a koncentrációja a perifériás erek felé csökken. Ennek megfelelően az inzulin, és az ábrán nem mutatott acetilkolin hatása a periféria felé nő. Továbbá az akut antioxidáns kezelés (SOD+CAT) csökkenti valamelyest az aorta érfal orto-tirozin szintjét (~12%-kal) és javítja a vazodilatációt, de ezek nem érték el a femorálisban látott szintet, ami arra utalhat, hogy az érfalban megmaradó, fehérjékbe beépült orto-tirozin továbbra is csökkenti a vazodilatációs képességet. A femorális artériában talált eredmények ettől eltérőek, mert ebben az alacsony oxidatív stresszt mutató érben, úgy tűnik, hogy a hidrogén-peroxid is részt vesz az inzulin kiváltotta vazodilatációban.

Azt is megfigyeltük, hogy a nagyobb oxidatív stresszt mutató torakális aortában a H_2O_2 +aminotriazol csökkentette az inzulin okozta vazorelaxációt és ezt a csökkentő hatást az ERK1/2 inhibitor PD98059 kivédte. Ez az eredmény világosan utal az inzulin vazodilatációs hatásának ERK1/2 általi csökkentésére. Fontos azt is figyelembe venni, hogy a H_2O_2 +aminotriazol kezelés önmagában (inzulin, acetilkolin, epinefrin, stb. nélkül) átmeneti vazokonstrikciót váltott ki, amely

dc_360_²⁰⁸

azonban nagyon jelentősen különbözött az egyes érszakaszokon. A legnagyobb a legmagasabb oxidatív stresszt mutató torakális aortában, majd kisebb az abdominális aortában és a legkisebb a legalacsonyabb oxidatív stresszt mutató femorális artériában volt. Ezt a vazokonstriktor hatását a H_2O_2 +aminotriazolnak az ERK1/2 gátló PD98059 dózisfüggően kivédte, ami az oxidatív stressz ERK1/2-n keresztül megvalósuló vazokonstriktor hatására utal. A H_2O_2 perifériás nagy erekre kifejtett vazodilatációs hatását már az arteria renalis dohányfüst okozta vazodilatációja esetén is igazoltuk. A H_2O_2 femorális artérián okozott vazodilatációját irodalmi adatok is megerősítik és arra utalnak, hogy ezt a hatását a H_2O_2 a szolubilis guanilát cikláz enzim direkt aktivációja révén fejtheti ki (7,17,40), de nem kizárt az sem, hogy az inzulinhatás kifejlődéséhez szükséges hidrogén-peroxid függő mechanizmuson keresztül hat.

A torakális aorta szakaszon az akut SOD+CAT kezelés kismértékben javította az ér vazodilatációs képességét, ami az NO és a szuperoxid szabad gyök (és/vagy a hidrogén-peroxid) interakciójára, és peroxinitrit képződésre utalhat. Az aorta inzulin kiváltotta vazodilatációját ugyanis legnagyobbrészt az NO okozza, mert az L-NAME (L-NG-nitroarginin metil észter) adása gátolta azt (ábrán nem mutatott eredmény).

Az orto-tirozin etetésével végzett vizsgálataink tovább erősítik azt a feltételezést, hogy az érbe beépült orto-tirozin csökkenti az ér vazodilatációs képességét. Alapállapotban is a torakális aortaszakasznak a legmagasabb az orto-tirozin tartalma és érdekes módon ennek a szakasznak a vazodilatációs készségét a para-tirozinos kezelés szignifikánsan javította. Ezek alapján fel kell vetni annak lehetőségét, hogy a magas oxidatív stressz állapotokban (diabetes mellitus, hypertonia, ischaemia, veseelégtelenség, dohányzás) a para-tirozin-szupplementáció kedvező lehet az oxidatív stressz szubakut hatásainak ellensúlyozására.

7. VIZSGÁLATOK 3: Szabad gyökök szerepe az anyagcsere szabályozásában és az érfalmeszesedésben

Rövidítések: ATP = adenozin trifoszfát, **BHT** = butilált hidroxi-toluén, **CAT** = kataláz enzim, **DMSO** = dimetil szulfoxid, **EDTA** = etiléndiamin-tetraecetsav, **G6Páz** = glukóz-6-foszfatáz enzim, **GPX1** = glutation peroxidáz-1 enzim, **GSH** = redukált glutation, **HGO** = hepatikus glukózkiáramlás, **HOMA** = homeostasis model assessment, **ISI** = insulin sensitivitási index, **NADH** = nikotinsav-amid adenin dinukleotid (redukált forma), **NO** = nitrogén minoxid, **SOD** = szuperoxid dizmutáz.

7.1. Az oxidatív stressz egyszerre vezethet inzulinrezisztenciához és atherosclerosishoz (XXI)

Ceriello és mtsai arra a megállapításra jutottak, hogy az inzulin-rezisztencia oxidatív stresszt okoz, és ennek szerepe van az atherosclerosis kifejlődésében (458). Kísérletes diabeteses állatmodellben megállapították, hogy a szabad gyökök elleni védekezés károsodik diabetesben. Sajnos cukorbetegségben a csökkent antioxidáns kapacitással egyidejűleg fokozott lipid-peroxidációs (454,455) és szuperoxid szabadgyök-képzésre való hajlam (456) figyelhető meg.

Véleményünk szerint a diabetes mellitusban fokozottan termelődő szabad gyökök csökkentik az inzulin hatékonyságát. Az inzulin anyagcserehatása ugyanis javul, ha az NO működése intakt (457). Magas szuperoxid szabadgyök-termelés esetén az NO hatása nem fejlődik ki, kevesebb cGMP termelődik (458-461), ami egyszerre vezet atherosclerosishoz és inzulin-rezisztenciához.

Hipotézisünket, közleményünk megjelenése óta, sokan igazolták, ezeket az adatokat az 4.5. fejezetben foglaltuk össze.

7.2. A szabadgyök-túltermelés gátolhatja a hepatikus glukózkiáramlást (XXII)7.2.1. Bevezetés

Jól ismert jelenség a hepatikus glukózkiáramlás (HGO) hyperglykaemia okozta gátlása (462). Felvetik annak lehetőségét, hogy a gátlás kialakulásában a glukóz-okozta autóreguláció is szerephez juthat, az inzulin kiváltotta gátlás mellett. A hyperglykaemia indukálta direkt glukóz-6-foszfatáz (G6Páz) gátlást igazolták hyperglikémiás clamp eljárással is (463). A G6Páz enzim gátlása megmagyarázhatja a HGO autóregulációját, hiszen a HGO kulcsenzime maga a G6Páz enzim. A G6Páz enzim hyperglykaemia kiváltotta gátlását elvileg okozhatják metabolikus intermedierek, azonban egy tanulmányban, a glukóz 25 metabolikus intermedierjét felhasználva, nem találtak olyat, amelyik fiziológiás vagy patofiziológiás koncentrációban gátolta volna a G6Páz enzimet (464). A lipid-peroxidáció azonban gátolhatja az enzim működését (38). A hyperglykaemia megváltoztatja az intracelluláris redox állapotot. A NADH/NAD⁺ arány növekszik, amit pszeudohipoxiának is hívnak, mert ugyanez a redox-változás figyelhető meg a hipoxiás sejtekben is. Mind hipoxiában mind

pszeudohipoxiában szabadgyökös reakciók aktiválódnak (465). A NADH/NAD⁺ arány növekedése volt megfigyelhető hyperglykaemiás patkányok májsejtjeiben (30 mmol/l-es vércukor mellett, 466).

A szabadgyökös károsodás valószínűsége tovább nő akkor, ha az elektron donor NADH akkumulációjával parallel a vasanyagcsere zavara is fennáll (467). A szabad vas képes elektront felvenni és leadni, azaz redox ciklusban részt venni, amelynek során a légköri oxigént szuperoxid szabad gyökké alakíthatja vagy lipid-peroxidációt indukálhat (38). A fentiek alapján az volt a hipotézisünk, hogy a hyperglykaemia hatására kialakuló növekvő NADH-koncentráció, szabadgyök-keltésen keresztül, gátolhatja a G6Páz enzimet. A folyamatot a következőképpen lehet ábrázolni:

Hyperglykaemia \Rightarrow intracelluláris NADH-emelkedés \Rightarrow szabad gyökök koncentrációjának növekedése \Rightarrow G6Páz enzim aktivitásának gátlása \Rightarrow HGO csökkenése.

In vitro modellt dolgoztunk ki, amelyben a patkány májból izolált mikroszoma frakció G6Páz enzim-aktivitását tanulmányoztuk NADH jelenlétében és hiányában, vas-komplexek alkalmazásával. A szabadgyökös termékek identifikálása céljából szabadgyökfogó anyagokat és enzimeket adtunk a reakciós elegyhez: szuperoxid dizmutáz enzimet (SOD, ami a szuperoxid szabad gyököt hidrogénperoxiddá alakítja); kataláz enzimet (ami a hidrogén-peroxidot bontja); dezferrioxamint (ami a ferro iont ferrivé alakítja, komplexálja azt és megakadályozza a redox ciklusban való részvételét); butilált hidroxi-toluént (BHT) és Trolox-ot (amik a lipid-peroxidáció gátlói); etanolt és dimetil szulfoxidot (DMSO, amik a hidroxil szabad gyök elfogói); és redukált glutationt (GSH, ami nem-specifikus szabadgyök-fogó).

7.2.2. Anyagok és módszerek

Minden reagens az elérhető legjobb minőségű volt.

A következő végkoncentrációkat alkalmaztuk: glukóz-6-foszfát: 10 mmol/l, kataláz: 2600 E/ml, SOD: 49 E/ml, dezferrioxamin: 2 mmol/l, NADH: 1,4 mmol/l, DMSO: 50 mmol/l, etanol: 100 mmol/l, GSH: 2 mmol/l, BHT: 0,1 mmol/l, Trolox: 0,1 mmol/l.

A máj mikroszoma frakciót hím, 200-250 g súlyú Sprague-Dawley patkányokból izoláltuk. A májat 0,9 %-os NaCl perfúziójával vérmentesítettük, gyorsan eltávolítottuk, majd jégen homogenizáltuk. A homogenizáló oldat összetétele a következő volt: 0,25 mol/l szukróz, 0,01 mol/l Tris-HCl (pH 7,4), 0,001 mol/l EDTA, 50 µmol/l dezferrioxamin. A mikroszoma frakciót differenciál-centrifugálással izoláltuk, majd kétszer mostuk 0,125 mol/l KCl-ban (EDTA nélkül), végül ugyanebben reszuszpendáltuk, és -75 °C-on tároltuk.

A vas komplexeket úgy készítettük, hogy ferri ammonium-szulfátot 0,1 mol/l-es HCL-ben oldottunk és utána hozzáadtuk a megfelelő komplexképzőt a kívánt koncentrációban. A ferri-ATP-t 1:20 arányban (vas:ATP) a ferri-EDTA komplexet 1:2 arányban (vas:EDTA) alkalmaztuk.

$dc_{360_{11}}$

A mikroszoma frakciót 50 mmol/l-es Tris-HCl (pH 7,4) pufferben inkubáltuk, a glukóz-6foszfát koncentrációja 10 mmol/l, a NADH-é 1,4 mmol/l, a vas-komplexeké 100 µmol/l volt. Az inkubációt 10-60 percig végeztük 37 °C-on. Kontroll vizsgálatainkban, ahol mikroszóma frakció nem volt, nem következett be NADH oxidáció (a maradék NADH koncentrációt 340 nm-en fotometriásan mértük; négy független vizsgálat eredménye szerint a ferri-ATP+Tris-HCl közegben 60 perc múlva 98,8±4,0 %, átlag±SD, Tris-HCl-ben ferri-ATP nélkül 102,1±4,8 % és ferri-EDTA-ban, Tris-HCl nélkül, H 7,4 mellett, 98,7±2,2 % volt).

A mikroszóma frakciót tartalmazó vizsgálatokban a reakcót 0,5 ml 10%-os triklór ecetsavval állítottuk le. A mintákat 4 °C-on, 14 percig centrifugáltuk és a felülúszó 1 ml-ét használtuk ahhoz, hogy a glukóz-6-foszfátból, a mikroszoma frakció G6Páz enzime által termelt anorganikus foszfátot (Pi) meghatározzuk. Az anorganikus foszfát mérésére a LeBel és mtsai által leírt módszert alkalmaztuk (468). A fehérje koncentrációját Lowry és mtsai metodikájával határoztuk meg (272).

Az eredményeket három, duplikátumban elvégzett mérés adataiból számoltuk és átlag ±SD formájában adtuk meg. A statisztikai analízis céljára ANOVA-t alkalmaztunk, és a SigmaStat for Windows, Version 1.0-t használtuk.

7.2.3. Eredmények

A 7.2.3.1. ábra a G6Páz enzim aktivitását mutatja az anorganikus foszfát (Pi)-termelés függvényeként. A G6Páz enzim aktivitása NADH jelenlétében csökkent. Az enzim aktivitása a ferri-ATP + NADH közegben szintén csökkent. A ferri-ATP + NADH azonban nem gátolta jobban a G6Páz enzimet, mint a NADH önmagában (p>0,05 minden időpontban).

dc_360_111



7.2.3.1. ábra A mikroszomális glukóz-6-foszfatáz enzim gátlása NADH-val és NADH-ferri-ATP-vel. Pi = a glukóz-6-foszfatáz enzim működése kapcsán felszabaduló anorganikus foszfát. Kontroll vs. NADH: 30. percben p=0,03, a 40. percben p=0,02, az 50. percben p<0,01. Ferri-ATP vs ferri-ATP + NADH: a 30., 40., 50. percben p<0,01.

Amennyiben a teljes rendszerben ferri-EDTA-t alkalmaztunk, akkor a NADH nem gátolta a G6Páz működését. A Tris pufferről azonban ismert, hogy gyenge hidroxil szabadgyök-fogó tulajdonságú. Ezért ferri-EDTA kísérleteinkből a Trist kihagytuk, a pH-t NaOH-val 7,4-re állítottuk és ekkor már a NADH a 45. és a 60. percben gátolta a G6Páz enzim aktivitását (7.2.3.2. ábra).

 $dc_{360_{11}}$



7.2.3.2. ábra A mikroszomális glukóz-6-foszfatáz enzim gátlása NADH-ferri-EDTA-val Tris puffert nem tartalmazó közegben. Pi = a glukóz-6-foszfatáz enzim működése kapcsán felszabaduló anorganikus foszfát. p<0,01 a 45. és a 60. percben.

A G6Páz enzim gátlásában szerepet játszó szabadgyökös folyamat analízise céljából szabadgyök-fogókat alkalmaztunk. Az eredményeket a 7.2.3.3. ábrán mutatjuk (ezekben a vizsgálatokban Tris-t alkalmaztunk, mivel a ferri-EDTA szerepét külön tanulmányoztuk). A NADH-okozta enzim-gátlást a SOD, a kataláz és a DMSO nem befolyásolta, de a vas-komplexáló dezferrioxamin és a lipid-peroxidációt gátló BHT és Trolox, valamint a nem-specifikus szabadgyök-fogó GSH teljesen kivédte az enzim-gátlást.

dc_360_111



7.2.3.3. ábra Gyökfogók hatása a NADH kiváltotta glukóz-6-foszfatáz gátlására. NADH vs. kontroll és NADH vs. dezferál (dezferrioxamin), trolox, BHT és GSH esetében p<0,01.

Amikor a ferri-EDTA hatását vizsgáltuk (Tris-mentes, 7,4-es pH-jú közegben), a SOD és BHT hatástalannak bizonyult. A hidroxil szabad gyök kialakulását gátló kataláz, és a hidroxil szabad gyököt elfogó DMSO és etanol, valamint a nem-specifikus scavanger GSH hatékonyan csökkentette a G6Páz enzim gátlását (7.2.3.4. ábra).



7.2.3.4. ábra Gyökfogók hatása a NADH-keltette glukóz-6-foszfatáz gátlására, Tris puffer hiányában és ferri-EDTA jelenlétében. NADH vs. kontroll és NADH vs. kataláz, etanol, DMSO és GSH esetében p<0,01.

7.3. Az antioxidáns rezveratrol anyagcserehatása (XXIII)

7.3.1. Bevezetés

Epidemiológiai vizsgálatok szerint Franciaországban az igen magas zsírfogyasztás ellenére alacsonyabb a cardiovasculáris mortalitás a hasonló fejlettségű államokhoz képest. E francia paradoxonnak nevezett jelenség hátterében az országra jellemző magas vörösbor-fogyasztást tételezték fel (469,470).

A vörösborban számos, az egészségre kedvező hatású polifenol található. Közülük az egyik legtöbbet vizsgált molekula a rezveratrol, aminek kedvező élettani és biokémiai hatásait számos in vitro és állatkísérletes vizsgálat már kimutatta (471), azonban a cukorbetegség területén humán tanulmány még nem történt.

Ismertek a rezveratrol cardiovasculáris rendszerre gyakorolt kedvező hatásai. Szerepe van a vazodilatáció javításában (472), amelyek hátterében az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) aktiválása áll (473). A rezveratrol in vitro (474) és in vivo (475) antioxidáns hatását is igazolták.

Ebben a vizsgálatunkban arra kerestünk választ, hogy cukorbetegek anyagcseréjét javítja-e, illetve ennek hátterében milyen mechanizmusok állhatnak. Befolyásolja-e a szervezet antioxidáns rendszereit, illetve hatással van-e az inzulin jelátviteli mechanizmusaira?

7.3.2. Betegek és módszerek

7.3.2.1. Betegek

Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélye és a betegek beleegyezését követően kettősvak, placebokontrollált, prospektív, randomizált elővizsgálatunkba 19 2-es típusú diabeteses, orális antidiabetikummal kezelt férfi beteget vontunk be, akik közül 10 beteg kapott rezveratrol tartalmú készítményt, 9-en placebot.

Azok kerültek be a vizsgálatba, akik elmúltak 18 évesek, beleegyeztek a vizsgálatba, klinikai jellemzők alapján – egyezően a WHO irányelvekkel – 2-es típusú diabetesesként diagnosztizált és kezelt betegek, kreatinin clearance-ük (C_{Cr}) Cockroft számítás (191) szerint nagyobb vagy egyenlő 90 ml/min-nél, és akik angiotenzin-konvertáló-enzim-gátlót (ACEI) vagy angiotenzin-receptor (ATIIR) blokkolót szedtek. Kizáró ok volt az inzulinkezelés, az alkohol vagy kábítószer abusus, súlyos májelégtelenség, súlyos szívelégtelenség (NYHA III-IV), ismert aktív autoimmun megbetegedés, akut infekció vagy meglévő daganatos betegség.

7.3.2.2. Vizsgálati protokoll

A szűrés alkalmával került sor a részletes szóbeli és írásos tájékoztatás után a beleegyező nyilatkozat aláírására. Ekkor általános belgyógyászati vizsgálatot (anamnézis, fizikális státusz, EKG,

vérnyomás, pulzus) és rutin laboratóriumi vizsgálatot (vérkép, szérumnátrium, -kálium, -karbamid, kreatinin, -összfehérje, -albumin, hemoglobin A_{1c} , GOT, GPT, ALP, LDH, GGT, bilirubin, prothrombin) végeztünk. A testsúly, a kor és a szérumkreatinin-szint alapján kiszámítottuk a betegek becsült C_{Cr} -ét a Cockroft-Gault formula segítségével.

A szűrést követően a kritériumokat teljesítő betegek lipidcsökkentő kezelését átmenetileg, a vizsgálat teljes idejére szüneteltettük. A vizsgálatot 4 hét kimosási időszakot követően kezdtük meg. A kimosási periódust követően, az I. vizit előtti napon a betegek 24 órán keresztül gyűjtötték vizeletüket. A gyűjtött vizeletből 24 órás C_{Cr}, vizeletalbuminürítés és vizelet orto-tirozin-ürítés vizsgálatokra mintát vettünk, ezt folyamatos szöveti cukorszint monitorozás (CGM, Medtronic MINIMED, SOF-SENSOR (MMT-7002) követte. Ezután éhomi vérvételt végeztünk a következő vizsgálatok elvégzése céljából: plazmaglükóz, széruminzulin, C-peptid, triglicerid, LDL, HDL, összkoleszterin, fruktózamin, nagy érzékenységű C-reaktív protein (hsCRP), fibrinogén, vérkép, eritropoetinszint, trombocita foszforilált Akt/összes Akt arány (pAkt/Akt). A vizsgált személyektől tesztétkezést követően 30, 60, 90 és 120 perc elteltével újabb vérmintákat vettünk (plazmaglükóz, széruminzulin, szérum-C-peptid, szérum-triglicerid). Ezután a részvevőket véletlenszerűen két csoportba, kezelt és kontroll csoportba soroltuk be. A kezelt csoport napi 2x1 tbl. 5 mg-os rezveratrolt, a kontroll csoport pedig 2x1 tbl. placebot kapott *per os*.

Két hét elteltével a II vizit, majd ismét 2 hét elteltével a III vizit alkalmával az első viziten elvégzett vizsgálatokat ismételtük és kiegészítettük amilin, GIP és GLP-1 hormonvizsgálatokkal.

7.3.2.3. Minták feldolgozása

A laboratóriumi vizsgálatok közül a vérkép, szérumnátrium, szérumkálium, szérumkarbamid, szérumkreatinin, szérumösszfehérje, szérumalbumin, hemoglobin A_{1c}, GOT, GPT, ALP, LDH, GGT, bilirubin, prothrombin, C-reaktív protein, vizeletalbumin-ürítés, plazma-glükóz, C-peptid, triglicerid, LDL, HDL, összkoleszterin, fruktózamin, nagy érzékenységű C-reaktív protein (hsCRP), fibrinogén, eritropoetinszint mérése a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetben beállított, rutinszerűen alkalmazott módszerekkel történt.

A HOMA_{IR}-t , a HOMA_{β}-t valamint az inzulin szenzitivitási indexet (ISI_{Stumvoll}) és a glükóz metabolikus clearence-t (MCR_{Stumvoll}) az irodalomból ismert képletek alapján számoltuk (476-478).

Az oxidatív stressz mértékét jelző vizelet-orto-tirozinszint mérésére HPLC módszert használtunk, a már leírt módon.

Perifériás vérből trombocitát izoláltunk a következőképpen: a betegektől éhgyomorra három műanyag citrátos csőbe vért vettünk, amelyeket szobahőmérsékleten 10 percig, 250 g-n centrifugáltuk. A felülúszót, a vörösvértestek érintése nélkül, műanyag pipettával leszívtuk. Ezt követően a trombocita dús plazmát 20mM Tris HCl és 150 mM NaCl tartalmú, pH:7,4-es mosópufferrel forgattuk
össze 1:1 arányban. A mintát 10 percig centrifugáltuk 500g-n. A mosást kétszer ismételtük. Az üledéket Hepes-Tyrode pufferben (140mM NaCl, 4,5mM KCl, 2,5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 11mM glükóz, pH 7,4) reszuszpendáltuk, a trombocitaszámot 5,0x10⁸/ml-re állítottuk be. A trombocitákból lizátumot készítettünk (20mM Tris HCl, 137 mM NaCl, 1% nonilfenoxi-polietoxi-etanol (NP40), 5% glicerin, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 25 mM aprotinin, 25 mM leupeptin, 2mM nátrium ortovanadát, 2mM nátrium-fluorid, 10mM tetrasodium pirofoszfát).

A lizátumokból Bradford féle metodikával, albumin standard használatával fehérjét mértünk. A trombocita pAkt-Akt arány mérésére Western blot technikát alkalmaztunk (pAkt(Ser473)/Akt, a már korábban leírt módszerünket alkalmaztuk.

A glukagonszerű peptid-1 (GLP-1), a glukózdependens inzulinotrop peptid (GIP), valamint az amilin meghatározáshoz a Millipore EGLP-35K Glucagon Like Peptide-1 (Active), Millipore EZHGIP-54K (Human GIP (total)), valamint a Millipore EZHAT-51K (Total Human Amylin) ELISA KIT-eket használtuk.

7.3.2.4. Vizsgálati készítmény és tesztétel

Az 5 mg növényi eredetű rezveratrolt (>98% transz-rezveratrol tartalom) tartalmazó és a placebo zselatin kapszulákat az Argina Nutraceuticals-tól (korábbi nevén Admarc Nutraceuticals, Hungary) szereztük be. A placebo kapszulák csak a mikrokristályos cellulózból álló hordozóanyagot tartalmazták. A betegek compliance-ét a névre szóló dobozokban maradt kapszulák száma alapján ellenőriztük. A kapszulák fehérje-, szénhidrát- és zsírtartalma elhanyagolható volt. A vizsgálat alatt mellékhatást, gyógyszer interakciót nem észleltünk.

A tesztétkezéshez szükséges Diben tápszert a Fresenius Kabi (Németország) cégtől szereztük be. A betegek 225 ml-t kaptak alkalmanként a következő összetételben: összenergia: 945kJ, fehérje : 10,13 g, szénhidrát: 20,81 g, zsír: 11,25 g.

7.3.2.5. Statisztikai analízis

A bemutatott adataink (CGM paraméterek, maximális intersticiális glukózszintig eltelt idő, HOMA_{IR}, orto-tirozin/vizelet kreatinin, pAkt/Akt) normál eloszlást mutattak. Az egyes viziteknél mért értékek összehasonlítására párosított kétmintás t-próbát használtunk, a placebo és rezveratrol csoportok közötti összehasonlításra kétmintás független t-próbát alkalmaztunk. A pAkt/Akt hányadosokat az I. vizitnél mért hányadosra normalizáltuk (az első vizitnél ezért nincs SEM érték megadva), így az I. és III. vizit összehasonlítására egymintás t-próbát használtunk. A dataink eloszlását az átlag \pm átlagok standard hibája (SEM) feltüntetésével jellemeztük. A klinikai paraméterek közötti összefüggés statisztikai vizsgálatára Pearson-féle korrelációs vizsgálatot alkalmaztunk. A statisztikai számításokhoz SPSS 13.0 for Windows programot használtunk.

7.3.3. Eredmények

A betegek kiindulási klinikai ill. laboratóriumi paramétereikben szignifikáns különbség nem volt (7.3.3.1. táblázat).

7.3.3.1. táblázat Betegek főbb klinikai jellemzői Az adatokat átlag ± SEM értékben adtuk meg; A szövődményeket esetszám szerint adtuk meg (i/n, igen/nem); az eGFR-t a Cockroft-Gault formula alapján számoltuk.

			Csoportok közötti statisztikai
	Resveratol	Placebo	különbség
	n=10	n=9	
Kor (év)	$57,9 \pm 2,5$	$52,5 \pm 0,4$	NS
Testsúly (kg)	$90,9 \pm 5,1$	$105,3 \pm 5,6$	NS
Plazmaglukóz (mmol/l)	$7,9 \pm 0,7$	$8,8 \pm 1,1$	NS
Fruktózamin (µmol/l)	281 ± 14	288 ± 15	NS
HbA _{1c} (%)	$7,50 \pm 0,69$	$7,65 \pm 0,50$	NS
Szérumkoleszterin (mmol/l)	$5,77 \pm 0,35$	$5,10 \pm 0,40$	NS
LDL-koleszterin (mmol/l)	3,40±033	3,29±0,36	NS
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,17±0,07	0,97±0,04	NS
Triglicerid (mmol/l)	3,20±1,05	2,77±0,44	NS
Nagy érzékenységű CRP (mg/l)	3,35±0.74	4,05±0.57	NS
eGFR (ml/min)	117 ± 10	138 ± 13	NS
Vizeletalbumin/creatinin (mg/mmol)	$4,07 \pm 1,38$	$1,95 \pm 1,01$	NS
Systoles vérnyomás (Hgmm)	140 ± 4	140 ± 6	NS
Diastoles vérnyomás (Hgmm)	86 ± 2	89 ± 4	NS
Diabeteses nephropathia (i/n)	7/3	4/5	NS
Diabeteses neuropathia (i/n)	0/10	2/7	NS
Perifériás artériás betegség (i/n)	1/9	1/8	NS
Angina pectoris (i/n)	0/10	1/8	NS
Ischémiás szívbetegség (i/n)	1/9	1/8	NS
Szívinfarktus (i/n)	0/10	0/9	NS
Stroke (i/n)	0/10	0/9	NS

A vizsgálat elkezdése után 2 héttel (második vizit) még nem jelentkeztek szignifikáns eltérések a vizsgált paraméterekben rezveratrol hatására sem.

A harmadik vizitre (4. hét végére) több szignifikáns eltérést is találtunk a két csoport között. A tesztétkezést követő 120 perc alatt 5 percenkénti CGM-mérések átlaga a rezveratrol csoportban a 25. (8,5 mmol/l \pm 0,86 és 7,2 mmol/l \pm 0,8; p=0,02), a 30. (8,8 mmol/l \pm 0,87 és 7,4 mmol/l \pm 0,8; p=0,02), és a 35. (8,7 mmol/l \pm 0,92 és 7,5 mmol/ \pm 0,7; p=0,03) percent szignifikánsan (p<0,05)

$dc_{360_{11}}$

csökkent a harmadik vizitre. A 35. perc után is alacsonyabb szöveti cukorértékek látszottak, de az eltérés nem volt szignifikáns. A placebo csoportban tesztétkezés utáni 120 perc alatt nem volt szignifikáns különbség a kiindulási CGM értékekhez képest (7.3.3.1. ábra).



7.3.3.1. ábra Tesztétkezés utáni átlagos szöveti glukóz szint (CGM mérés) a rezveratrol (a) és a placebo (b) csoportban; *: p<0.05 vs. 1. vizit

ldő (perc)

(b)

A CGM-mel mért maximális intersticiális vércukorszintig eltelt idő szignifikánsan megnyúlt a rezveratrolt szedő betegeknél (49,50 \pm 4,37 perc és 81,25 \pm 7,24 perc; p=0,006), szemben a placebot

$dc_{360_{120}}$

szedő betegekkel, akiknél nem változott (41±9,7 perc és 58,1±6,3 perc, NS). A harmadik viziten a maximális intersticiális vércukorszintig eltelt idő a rezveratrol és a placebo csoport között is szignifikánsan különbözött (p=0,03; 7.3.3.2. ábra).



7.3.3.2. ábra Tesztétkezés után folyamatos intersticiális glukózmonitorral (CGM-mel) mért maximális intersticiális cukorszintig eltelt idő; *: p=0,006; **: p=0,030; NS: nem szignifikáns. A rezveratrolt szedő betegek inzulin-rezisztenciája (HOMA_{IR}) szignifikánsan csökkent a harmadik vizitre (6,20±1,11 és 4,26±0,78, p=0,046), és a placebot szedők értéke nem változott. A

harmadik vizitre a két csoport között is szignifikáns különbség volt (8,82±2,08 és 4,26±0,78, p=0,049, 7.3.3.3. ábra).



7.3.3.3. ábra Az inzulin-rezisztencia (HOMA_{IR}) változása 4 hét után a rezveratrol és a placebo csoportban; *: p=0,046; **: p=0,049.

dc_360_²²1

A HOMA_{β} értékében azonban nem találtunk szignifikáns eltérést sem a placebo (118,51±29,89 és 129,66±34,34), sem a rezveratrol csoportban (95,91±19,32 és 74,68±11,00), sem a csoportok között.

A vizelet-orto-tirozin-kiválasztás (vizelet-orto-tirozin/kreatinin arány) szignifikánsan csökkent rezveratrol kezelés hatására (23,3 \pm 8,0 µmol/mol és 10,7 \pm 4,1 µmol /mol, p=0,04), a placebo csoportban nem változott (12,8 \pm 4,7 és 33,5 \pm 12,2, p=NS, 7.3.3.4. ábra).



7.3.3.4. ábra Vizelet orto-tirozin/creatinin (orto/creat) arány változása négy hét után; *: p=0,040.

A rezveratrol kezelés negyedik hetére a foszforilált Akt/Akt (pAkt/Akt) szignifikánsan növekedett (100% és 214,5±46,7 %, p=0,037), a placebo csoportban nem változott (100 % és 123,0±34,1%, NS, 7.3.3.5. ábra).

dc_360_121



7.3.3.5. ábra Az Akt foszforilációjának változása 4 hét után; *: p=0,037.

A harmadik vizit idején sem az amilin-, sem a GIP-, sem pedig a GLP-1-szintben szignifikáns változást nem találtunk: az amilinszint a rezveratrolt szedőkben $2,98\pm0,28$ pM, a placebo csoportban $3,11\pm1,03$ pM (p=NS), a GIP-szint a rezveratrolt szedőkben $38,22\pm3,33$ pg/ml, a placebo csoportban $36,23\pm3,33$ pg/ml (p=NS), a GLP-1-szint a rezveratrolt szedőkben $7,7\pm0,68$ pM, a placebo csoportban $7,2\pm0,32$ pM (p=NS) volt.

7.4. Az endogén ouabain szérumszintje összefügg a hipertoniás vesebetegek cardiovasculáris állapotával. Az orto-tirozin lehetséges szerepe (XXIV, XXV, LXIII) 7.4. Bayazetés

7.4.1. Bevezetés

Az endogén ouabain (EO) közel két évtizede ismert fiziológiás gátlója a Na⁺/K⁺-ATP-áznak. A gátlás hatására nő az intracelluláris Na⁺-koncentrációja, ami aktiválja a Na⁺/Ca²⁺ cseretranszporter működését, amely végül a sejteken belüli kalciumszint növekedéséhez vezet. Ezen folyamat végeredményeként a szívizomzatban fokozott összehúzódás, az erekben vazokonstrikció jön létre

Ezenkívül az EO alacsony (nanomoláris) koncentrációban, a Na⁺/K⁺-ATP-ázhoz való kötődése révén számos jelátviteli út serkentése által képes simaizom- és fibroblasztsejteket aktiválni, szabad gyököt termeltetni, NF- κ B-t aktiválni, ezáltal TNF-alfa és IL-6 termeléshez vezetni (479), amely így hozzájárul a szívizomzat és az erek átépüléséhez, a hypertonia kialakulásához (7.4.1.1. ábra).

 $dc_{360_{12}}$



7.4.1.1. ábra Az endogén digitáliszok Na⁺/K⁺-ATP-ázhoz való kapcsolódásának következménye lehet a reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelődése. Rövidítések magyarázatát lásd a szövegben. Bagrov AY és társa által készített ábra adaptált és módosított változata (480).

A mellékvesekéregben képződő EO elválasztási ingerének az adrenokortikotrop hormon (ACTH) és az angiotenzin II (AT II) emelkedését, a szimpatikus idegrendszer aktiválódását, valamint a só-függő krónikus volumenterhelést tartják (481,482). Emellett ismeretes, hogy fizikai terhelésre mind kutyákban, mind emberben az EO szintje rövid időre, többszörösére emelkedik, amely emelkedés gátolható előzetes β-blokkoló és angiotenzin-konvertáló-enzim-gátló (ACE-gátló) adásával (483). Feltételezik a szimpatikus idegrendszer és a renin-angiotenzin-rendszer (RAS) szerepét az EO-elválasztás fokozódásának létrejöttében. Az ACE-gátló-kezelés hatása, valamint az AT II-receptor blokkolásának additív hatása az EO-termelés csökkentésére eddig humán vizsgálatokból nem ismert. Az EO szintjét humán vizsgálatokban szignifikánsan magasabbnak találták kezeletlen hypertoniás betegekben és olyan normotenzív egyénekben, akik családi anamnézisében hypertonia volt ismert (484-486). Kevés humán vizsgálatot találunk azonban a különböző kezelt hypertoniás betegcsoportokban mért plazma- és vizelet-EO szintjéről és annak komplex, cardiovasculáris paraméterekkel mutatott összefüggéseiről. Emellett nem találunk humán vizsgálatból származó irodalmi adatot az EO-szintek és a korai érrendszeri elváltozások markerei (artériás stiffness markerek) között, annak ellenére, hogy a kettő közötti kapcsolatot kísérletes adatok alátámasztják.

Az EO által serkentett jelátviteli utak közül az ERK1/2 út oxidatív stressz-el való kapcsolata jól ismert (480), amely a vaszkuláris rendszert károsítva ateroszklerózist, magas vérnyomást eredményezhet. Mivel a hypertonia, a diabétesz és a vesebetegségek szövődményeinek progressziójában a fokozott szabadgyök-képződés szerepe jelentős, így ennek mérése különösen

fontos a szövődmények kialakulása szempontjából. Az oxidatív folyamatok, különösen a hidroxil szabad gyök hatására képződő specifikus markerek (orto- és meta-tirozin) elfogadott jelzői ennek a folyamatnak. Az EO által elindított oxidatív jelátviteli utak ugyan ismertek, azonban nem található adat arra vonatkozólag, hogy az EO-termelés és az oxidatív stressz markerek között összefüggés lenne emberben is.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy hypertonia, illetve hypertonia és egyéb társbetegség (2-es típusú diabetes mellitus, krónikus vesebetegség) egyidejű fennállása esetén meghatározzuk az endogén ouabain szintjét mind a plazmában, mind a vizeletben, illetve megvizsgáljuk, hogy a mért EO-szintek a fent említett betegségekben gyakran észlelhető diasztolés funkció zavarral, valamint az erek rugalmasságával milyen kapcsolatot mutatnak. Továbbá vizsgáltuk a vizeletben és plazmában mért orto-tirozin – amelyek a hidroxil szabadgyök-képződés egyik megbízható markere – és az EO kapcsolatát a fent említett állapotokban. Egy másik tanulmányban vizsgálni kívántuk, hogy az EO-termelés – az ACE-gátlók ismert EO- csökkentő hatása mellett – kettős RAS blokáddal (ACE-gátló + angiotenzin receptor blokkoló (ARB) szedésével) jobban csökken-e, és ennek megfelelőek-e a betegek a cardiovasculáris paraméterei is?

7.4.2. Módszerek

Első vizsgálatunkba 41 hypertonia miatt kezelt felnőtt beteget vontunk be, akik közül 10 csak hypertoniában (HT), 11 hypertoniában és 2-es típusú diabetes mellitusban (HT+DM), 10 hypertoniában, 2-es típusú diabetes mellitusban és vesebetegségben (HT+VE), valamint 10 hypertoniában és vesebetegségben (HT+VE) szenvedett.

Második vizsgálatunkban 35 ismert és gondozott (medián 2,6 év) hypertoniás, vesebeteg vett részt, akiket két csoportra osztottunk aszerint, hogy csak ACE-gátló (MONO-csoport, n=20), illetve ACE-gátló és ARB kezelésben (DUAL-csoport, n=15) is részesültek.

A plazma- és vizelet-EO meghatározását radioimmuno-assay (RIA) módszerrel végeztük Ouabain¹²⁵I segítségével. RIA kit Α cardiovasculáris állapot felmérésére intima-média-vastagság, echokardiográfia, artéria karotiszon mért érfali merevség (e-tracking) (ALOKA SSD 500, illetve 550), illetve 24 órás vérnyomás monitorozás meghatározás történt. Emellett nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) segítségével határoztuk meg a vizelet- és plazma-orto-tirozin szintjét, valamint a vizeletalbumin ürítését (totál albumin). Az immunreaktív albumin meghatározása rutin immunturbidimetria segítségével történt. A pro-BNP szintjének megállapításához automatizált ElecsysTM rendszert (Roche Diagnostics), a vizelet katekolamin meghatározáshoz elektrokémiai detektorral felszerelt HPLC-t (BIO-RAD Clinical HPLC System) használtunk. A betegek vér- és vizeletmintáinak egyéb vizsgálatát (ionok, vérkép, májfunkció, gyulladásos paraméter, vizelet általános és üledék) rutin módszerekkel mértük.

7.4.3. Eredmények

Első vizsgálatunkban a legmagasabb plazma-EO-szintet $(19,7 \pm 9,5 \text{ pmol/l})$ a HT+DM+VE csoportban találtuk, amely szignifikánsan nagyobb volt, mint a HT+VE csoportban. A többi csoport plazma-EO-, valamint a vizelet-EO szintje között nem találtunk szignifikáns különbséget (7.4.3.1. táblázat).

	HT	HT+DM	HT+DM+VE	HT+VE
Férfi/nő	5/5	4/7	5/5	4/6
Kor (év)	$59,1 \pm 6,8^{\$}$	$65,81 \pm 8,6$	$69,5 \pm 3,6$	$60,4 \pm 7,9$
BMI (kg/m ²)	$29{,}9\pm5{,}9$	$29,\!53\pm5,\!7$	$28,9 \pm 3,9$	$28,7 \pm 4,7$
Hypertonia fennállása	$5,6 \pm 2,1$ §	$8,3 \pm 2,3$	$9,6 \pm 3,8$	$7,1 \pm 3,1$
(év)				
2-es típusú diabetész	-	$6,1 \pm 3,1$	$7,0 \pm 2,7$	-
mellitus fennállása (év)				
Krónikus vesebetegség	-	-	$9,7 \pm 3,2$	$8,6 \pm 3,4$
tennallasa (ev)	$5.0 \pm 0.25^{\#}$	65 ± 1.0	$6.2 \pm 0.5^{\#}$	5.5 ± 0.2
$HDA_{1c}(\%)$	$5,9 \pm 0,23$	$0,3 \pm 1,0$	$0,2 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$
Kreatinin clearance 24-	$109,3 \pm 21.7^{\$,\#}$	$131,8 \pm 24.2^{\$,\#}$	$62,4 \pm 18,9$	$66,9 \pm 26,6$
li (iii/perc) Vizelet-FO (nmol/nan)	$102.46 \pm$	$24,3^{-1}$	97 67 + 52 51	97.30 ± 21.17
vizelet-LO (pinoi/nap)	40.98	25.60	77,07 ± 52,51	77,50 ± 21,17
EO-clearance (ml/perc)	12.66	10.20	8.97 (10.11)	14.59 (17.34)
(, F)	(16,97)	(20,59)		
Se. pro-BNP (pg/ml)	25,3 (78,4) [§]	76,9 (86,5) [§]	268,4 (228,4)	131,6 (354,7)
Karotisz intima-média	$0,\!64 \pm 0,\!17$	$0,74 \pm 0,22$	$0,88 \pm 0,09$	$0,79 \pm 0,27$
vastagság (mm)				
Antihipertenzív kezelés	НТ	HT+DM	HT+DM+VE	HT+VE
ACE-gátlók (%)	80,0	72,7	100,0	90,0
ARB (%)	70,0	54,5	50,0	20,0
β- blokkolók (%)	40,0	54,5	70,0	70,0
Ca-csatorna-blokkolók	70,0	54,5	70,0	60,0
(%)				
Vízhajtók (%)	40,0	54,5	80,0	40,0
Antidiahatikum taránia	П	HTIDM		HTIVE
Antialabelikum-terapia	<u></u>	$\frac{\mathbf{n}\mathbf{I} + \mathbf{D}\mathbf{N}\mathbf{I}}{54.5}$		
ontidiabetikumok	0,0	54,5	00,0	0,0
(%)**				
Inzulin (%)**	0,0	45,5	50,0	0,0
		· · · ·		

7.4.3.1. táblázat A	A betegek	klinikai és	laboratóriumi	jellemzői
---------------------	-----------	-------------	---------------	-----------

Az adatok megjelenítése átlag \pm szórás (S.D.), vagy medián és (interkvartilis tartomány), illetve gyakoriság (%).*: A vizelet katekolamin meghatározása reggeli friss vizeletből történt. **: P<0,05 a csoportok között Chi négyzet próba alapján. §: P<0,05 a HT+DM+VE csoporttal összehasonlítva.#: P<0,05 a HT+ VE csoporttal összehasonlítva se. = serum; HT = hypertonia betegség; DM = 2-es típusú diabetes mellitus; VE = krónikus veseelégtelenség; EO = endogén ouabain; BNP = brain natriuretic peptide.

dc_360_²²

A csoportok között nem volt különbség az antihipertenzív kezelésben, az ABPM paraméterekben, az echokardiográfiás és az érfali merevség paramétereinek vonatkozásában (a jobb pitvar nagysága kivételével).

A plazma-EO számos szignifikáns korrelációt mutatott, főként az éjszakai vérnyomás paraméterekkel, a kettő közötti kapcsolat feltehetően az emelkedett éjszakai/hajnali szimpatikus tónusból adódhat, mivel a vizelet-katekolamin- és EO-szintek korreláltak.

Lineáris regressziós analízissel az éjszakai artériás középnyomás független prediktorának a plazma-EO, a kor és az szív bal kamrai tömegindex (LVMI), a karotisz artéria β -stiffness prediktorának pedig a vizelet-EO bizonyult (7.4.3.3. táblázat)

Függő váltogá, áiszakai MAD	Független	Standard	р	
Fuggo valtozo: ejszakai MAP	prediktor	Beta	Г	
Összes beteg	Kor	-0,426	0,005	
	LVMI	0,375	0,016	
	Plazma-EO	0,426	0,004	
	Független	Standard		
Függő változó: karotisz β-stiffness	prediktor	Beta	Р	
Összes beteg	Vizelet-EO	0,412	0,011	

7.4.3.3. táblázat A lineáris regresszió eredményei

MAP = artériás középnyomás; PWV = pulzushullám terjedési sebesség; LVMI = balkamrai tömeg-index; TPR = totál perifériés ellenállás; E/A = diasztolés diszfunkció;<math>IMT= intima média vastagság; BMI = test tömeg index; GFR = glomerulus filtráció ráta; EO = endogén ouabain.

Az éjszakai MAP lineáris regressziós modelljében lévő változók: LVMI, stroke index, TPR index, ejekciós frakció, E/A, vizelet noradreanlin, IMT, β -stiffness, karotisz augmentaciós és PWV, kor, BMI, GFR, plazma- és vizelet-EO

A karotisz β-stiffness lineáris regressziós modelljében lévő változók: 24 órás szisztolés és diasztolés vérnyomás, LVMI, stroke index, TPR index, ejekciós frakció, vizelet noradrenalin, IMT, kor, BMI, GFR, plazma- és vizelet-EO

Az endogén ouabain frakcionált exkréciója a vesebeteg csoportokban magasabb volt és értéke korrelációt mutatott az éjszakai artériás középnyomással, valamint a szív végszisztolés és végdiasztolés átmérőjével. Az összes beteg adatait együtt vizsgálva szignifikáns kapcsolatot találtunk a vizelet-EO-szintje és karotiszon mért pulzushullám terjedési sebesség (PWV), valamint a β -stiffness között. Az EO frakcionált exkréciója is szoros összefüggést mutatott a karotisz-PWV, valamint a β stiffness értékével a HT+DM csoportban.

A betegek oxidatív stressz markereinek és gyulladásos paramétereinek átlagait a 7.4.3.4. táblázat tartalmazza. Egyedül a plazma orto-tirozin-szintekben találtunk különbséget; a HT csoporté szignifikánsan alacsonyabb lett, mint a HT+DM+VE és a HT+VE csoporté.

	HT	HT+DM	HT+DM+VE	HT+VE
Plazma para-tirozin	$49,2 \pm 10,9$	$46,3 \pm 9,5$	$41,9 \pm 7,2$	$47,2 \pm 9,3$
(µmol/l)				
Plazma orto-tirozin	2,6 (40,3) ^{§,#}	$34,3 \pm 20,7$	$64,1 \pm 21,7$	$69,3 \pm 48,3$
(nmol/l)				
Plazma fenilalanin	$44,8 \pm 8,5$	$38,0 \pm 11,1$	$38,8 \pm 8,1$	$46,4 \pm 11,8$
(µmol/l)				
Vizelet para-tirozin	$22,7 \pm 13,6$	$15,9 \pm 9,0$	$14,0 \pm 8,4$	$12,5 \pm 9,9$
(µmol/l)				
Vizelet orto-tirozin	18,1 (60,2)	19,6 (118,7)	28,2 (114,7)	8,3 (200,9)
(nmol/l)				
Vizelet fenilalanin (µmol/l)	19,6 (19,0)	13,7 (37,8)	5,8 (32,8)	6,5 (15,4)
Kilégzett NO (ppb)	$10,\!44 \pm 8,\!31$	$11,09 \pm 9,22$	$21,2 \pm 18,35$	$19,4 \pm 8,48$
C-reaktív protein (mg/l)	2,25 (2,35)	1,20 (4,00)	3,15 (3,68)	2,55 (2,52)

7.4.3.4. táblázat Az oxidatív és gyulladásos markerek átlagai a betegcsoportokban

Az adatok megjelenítése átlag \pm szórás (S.D.), vagy medián és (interkvartilis tartomány). Fex = frakcionált exkréció; NO = nitrogén-monoxid,§: p<0,05 HT+DM+VE csoporthoz viszonyítva,#: p<0,05 HT+VE csoporthoz viszonyítva.

A plazma o-tyr szintje nem mutatott jelentős összefüggést az EO-plazmaszintekkel sem az összpopulációban, sem a csoportokban. Az o-tyr a vizsgált szubklinikus cardiovasculáris paraméterekkel sem mutatott összefüggést. A plazma-o-tyr negatív korrelációt mutatott a vesefunkciós paraméterekkel, mint pl. a kreatinin clearance (7.4.3.1. ábra) és pozitív asszociációt a szérumkreatininnel (R=0,439, P=0,004).



7.4.3.1. ábra A plazma o-tyr és a kreatinin clearance összefüggése az összmintában (R=0,430; p=0,007)

$dc_{360_{12}}$

Második vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a hosszan alkalmazott kettős RAS-blokád nem csökkenti jobban a plazma- és vizelet-EO szintjét, mint önmagában az ACE-gátló-kezelés. A betegek cardiovasculáris paraméterei néhány echokardiográfiás paraméter kivételével nem különböztek a két csoportban. A plazma-EO szintje korrelált számos éjszakai vérnyomás paraméterrel, mint a szisztolés vérnyomás vagy az artériás középnyomás a MONO-csoportban. Szintén csak a MONO-csoportban a vizelet-EO a karotiszon mért pulzushullám terjedési sebességgel és a β-stiffness értékével mutatott szignifikáns összefüggést. A DUAL-csoportban ezeket a korrelációkat nem találtuk meg.

A vizeletalbuminok vizsgálata során azt találtuk, hogy a nem immunreaktív albumin szoros összefüggést mutatott a szív diasztolés diszfunkciójával, a diasztolés diurnális index-el a MONO-csoportban, ellenben a kettős RAS-gátlóval kezelt betegek között a nem immunreaktív vizeletalbumin csak a plazma-EO-val korrelált.

7.5. Megbeszélés

7.5.1. A szabadgyök-túltermelés gátolhatja a hepatikus glukózkiáramlást

Nem csak az inzulin és más hormonok játszanak szerepet az anyagcsere szabályozásában, hanem számos anyagcsere intermedier is hasonló hatású. Azt, hogy a diabeteses pszeudohipoxia által keltett szabad gyököknek direkt, inzulintól független hatása lehet az anyagcserére mi vetettük fel először patkány máj mikroszóma frakción, a G6Páz enzimmel végzett vizsgálatunkban. Általánosan ismert klinikai tény, hogy a hipoxiás máj (pl pangásos máj), vagy az alkoholos májkárosodás, amely az etanol metabolizmusa következtében ugyanolyan pszeudohipoxiához vezet (NADH túlprodukció), mint a diabeteses állapotot, hypoglykaemia hajlammal jár együtt. Mind a pszeudo- (diabetesz, etanol fogyasztás), mind pedig az igazi hipoxia esetén a felszaporodó NADH hatására - ami a sejt számára azt jelenti, hogy bőségesen áll rendelkezésre szubsztrát- csökken a máj glukózkiáramlása.

Vizsgálataink szerint a hyperglykaemiát utánzó magas NADH-koncentráció csökkenti a G6Páz aktivitását. A gátlás mértéke (26-33%) mennyiségileg nagyon közel áll a hyperglykaemás clamp technikával in vivo nyert adatokhoz (26%, 463). A ferri-ATP komplex nem növelte a NADH-nak a G6Pázra kifejtett gátló hatását. Ezek alapján a nyomokban jelenlévő vas, vagy a mikroszóma frakcióban található ferritinből a NADH által mobilizált vas elégséges lehet ahhoz, hogy a NADH kifejthesse G6Pázt gátló hatását. Erre utalhat a vas redox ciklusát gátló dezferrioxamin hatásossága a NADH okozta gátlás kivédésében. Az intracelluláris, nyomokban jelenlévő, mobilizált, redox ciklusban résztvevő vas lényeges része a pszeudohipoxia jelentőségéről kialakított elképzelésünknek. Igen alacsony koncentrációban marad vas a mikroszóma frakcióban még a dezferrioxaminos preparáció után is (293). A vas-komplex nélküli kísérletekben a G6Páz enzim gátlásáért elsősorban a lipid-peroxidáció tehető felelőssé, hiszen a szuperoxid szabad gyököt átalakító SOD, a hidrogén-peroxidot bontó kataláz és a hidroxil szabad gyököt elfogó DMSO hatástalan volt, a lipid-peroxidációt

$dc_{360_{12}}$

gátló BHT, Trolox és a nem-specifikus szabadgyökfogó redukált glutation azonban csökkentette vagy kivédte az enzimkárosodást.

Amennyiben a G6Páz enzim károsodását NADH és ferri-EDTA jelenlétében tanulmányoztuk (ami hatékony mikroszómális hidroxil szabadgyök-keltő rendszer) nem találtunk enzimaktivitáseltérést. A hidroxil szabadgyök-elfogó Tris-puffer kihagyása után kialakuló enzimaktivitás-csökkenés kivédhető volt katalázzal, etanollal, DMSO-val és hatástalannak bizonyult a SOD és a BHT, tehát hidroxil szabadgyök-keltette károsodásról volt szó.

Ezek a vizsgálataink nem csak a hepatikus glukózkiáramlás fiziológiás szabályozására mutatnak érdekes modellt, hanem magyarázhatják a patológiás állapotokban a májban felszaporodó szabad gyökök hypoglykaemiához vezető hatását. Ilyen állapot lehet pl. a hypoxiás (pangásos) máj és az alkoholos májkárosodás. Felmerül azonban annak lehetősége is, hogy a 2-es típusú cukorbetegséggel gyakran együttjáró nem alkoholos zsírmáj (NAFLD, NASH) esetében is megnövekedhet a hypoglykaemia kockázata a nagyobb mennyiségben termelődött szabad gyökök miatt. Ezeknek a soroknak az írásakor (2013. január elején) a PubMed-ben nem volt található olyan cikk, amely a NASH vagy az NAFLD és a hypoglykaemia-hajlam kapcsolatát vizsgálta volna.

7.5.2. Az antioxidáns rezveratrol anyagcserehatása

Vizsgálatunkban a transz-rezveratrol hatását vizsgáltuk 2-es típusú diabeteses betegekben. Napi 2x5 mg orálisan bevitt rezveratrol javította az inzulin-rezisztenciát, csökkentette a vércukorértékeket, valamint a vércukorcsúcs idejét is eltolta. Ezen kívül növelte a pAkt/Akt arányt valamint csökkentette az oxidatív stressz mértékét. Nem volt hatással a β -sejtfunkcióra (HOMA_{β}) illetve nem befolyásolta a GLP-1-, GIP- és az amilinszintet. Ismert, hogy az oxidatív stressznek fontos szerepe van az inzulin-rezisztencia kialakításában, a rezveratrol pedig hatékony direkt szabadgyökfogó (487) illetve közvetett módon is csökkenti az oxidatív stresszt azáltal, hogy növeli az antioxidáns enzimek expresszióját, csökkenti a NAD(P)H-oxidáz enzim aktivitását, az iNOS expresszióját és mérsékli az eNOS szétkapcsolását (488). Eredményeink – a korábbi vizsgálatokkal összhangban – arra utalnak, hogy a rezveratrol valóban hatékonyan csökkenti az oxidatív stresszt, ami vizsgálatunkban az orto-tirozin vizeletűrítésének csökkenéseként nyilvánult meg.

Ismert a rezveratrol vércukorcsökkentő hatása diabeteses patkányokban, aminek hátterében Akt és eNOS aktivációt találtak (489,490). Az Akt foszforiláció (pAkt/Akt arány növekedése) egyik fontos lépése az inzulin jelátviteli mechanizmusának (491). Jelen vizsgálataink arra utalnak, hogy a rezveratrol vércukorcsökkentő hatásában az ember esetében is szerepet játszhat az Akt jelátvitel aktiválása.

7.5.3. Az endogén ouabain szérumszintje összefügg a hipertoniás vesebetegek cardiovasculáris állapotával. Az orto-tirozin lehetséges szerepe

Első vizsgálatunk alapján megállapíthatjuk, hogy az EO-szintje a társbetegségekkel rendelkező hypertoniás betegekben voltak a legmagasabbak. Szintje vizsgálataink alapján összefüggést mutatott az éjszakai vérnyomással, valamint a szubklinikus szervkárosodásokkal kezelt hypertoniás betegekben. Így lehetséges, hogy szerepet játszik a vérnyomás diurnális ritmusának megváltozásában és az érfali merevség kialakulásában.

A plazma-EO-szintje – valószínűleg vasokonstriktor hatásának következtében – fontos tényező lehet a karotisz érfali merevségnek és a rezisztencia arteriolák állapotának. A PWV és a β-stiffness pozitív korrelációt mutat az endogén digitáliszok vizeletben mért szintjével, amelyek a nagyerek merevségére utalnak. A plazma-EO augmentációs index-szel mutatott inverz korrelációja emellett jól tükrözi a hypertoniás betegekben a rezisztencia arteriolák összehúzódott állapotát. Vizsgálatunk eredményei alapján a vesefunkciónak szerepe lehet az EO szintjének szabályozásában, mivel az EO frakcionált exkréciója a vesebeteg csoportokban szignifikánsan nagyobb. Az o-tyr szintje nem mutatott összefüggést az EO-, és vérnyomás értékkel valamint a célszerv-károsodást jelző paraméterekkel, viszont korrelált a vesefunkciós paraméterekkel.

Második vizsgálatunk eredményei alapján a kettős RAS-gátlás nem csökkenti jobban az EO-szintet, mint önmagában az ACE-gátló kezelés, ellenben a kettős RAS-gátlásban részesülő betegek között az EO és a célszervkárosodások közötti összefüggések megszüntek. A nem immunreaktív vizeletalbumin-szint meghatározása ígéretes lehet célszervkárosodások súlyosságának meghatározásában kezelt hypertoniás betegek esetén is.

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

Az angol nyelvű közlemények a disszertációban való megjelenés sorrendjében:

- **I.** Wagner Z., **Wittmann I.**, Mazák., Schinzel R., Heidland A., Kientsch-Engel R., Nagy J.: Nε-(Carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: Role of renal function. *Am J Kidney Dis* 2001;38(4):785-791. **IF: 3.614**
- II. Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, Maász A, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene is associated with HbA1c Levels and the onset of type 2 diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2010;118(3):209-12. IF: 1,826
- **III.** Wagner Z, Degrell P, Lukáts B, Niwa T, Molnár GA, Markó L, Karádi Z, **Wittmann I.** Accumulation of renin and imidazolone in peritubular capillary endothelial cells in insulin-resistant hypertensive rats. J Nephrol. 2011;24(5):656-64. **IF: 1,654**
- IV. Degrell P, Cseh J, Mohás M, Molnár GA, Pajor L, Chatham JC, Fülöp N, Wittmann I. Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy. Life Sci. 2009;27:84(13-14):389-93. IF: 2,560
- V. Wittmann I., Molnár G. A., Degrell P., Wagner Z., Tamaskó M., Laczy B., Brasnyó P., Wagner L., Nagy J.: Prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Diab Res Clin Pract* 2005;68S1:S36-S42.
- VI. Nagy J., Kovács T., Wittmann I.: Renal protection in IgA nephropathy requires strict blood pressure control. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1533-39. (Editorial) IF: 2.976
- VII. Vas T., Wagner Z., Jenei V., Varga Zs., Kovács T., Wittmann I., Schinzel R., Balla Gy., Balla J., Heidland A., Nagy J.: Oxidative stress and non-enzymatic glycation in IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 2005;64(5):343-351. IF: 1.543
- VIII. Markó L, Molnár GA, Wagner Z, Böddi K, Koszegi T, Szabó Z, Matus Z, Szijártó I, Mérei A, Nagy G, Wittmann I. Measurement of the modification and interference rate of urinary albumin detected by size-exclusion HPLC. Physiol Meas. 2009;30(10):1137-50. IF: 1,430
 - IX. Markó L, Cseh J, Kőszegi T, Szabó Z, Molnár GA, Mohás M, Szigeti N, Wittmann I. Storage at -80 degrees C decreases the concentration of HPLC-detected urinary albumin: possible mechanisms and implications. J Nephrol. 2009;22(3):397-402. IF: 1,252
 - X. Degrell P, Wagner Z, Szijarto IA, Wagner L, Marko L, Mohas M, Cseh J, Wittmann I. Morphology of glomerular haematuria is reproduced in vitro by carbonyl stress. Nephron Exp Nephrol. 2008;110(1):e25-30. IF: 1,596
 - XI. Wittmann I, Mazák I, Pótó 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(2):171-87. IF: 1,706
- XII. Wagner Z, Molnár M, Molnár G. A, Tamaskó M, Laczy B, Wagner L, Csiky B, Heidland A, Nagy J, Wittmann I: Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hamodialyis patients. *Am J Kidney Dis* 2006;47:294-300 IF: 4,072
- XIII. Nagy J, Demaster EG, Wittmann I, Shultz P, Raij L. Induction of endothelial cell injury by cigarette smoke. Endothelium. 1997;5(4):251-63.
- **XIV.** Mazák I, **Wittmann I,** Wagner L, Wagner Z, Degrell P, Vas T, Molnár GA, Nagy J. Cigarette smoke and its formaldehyde component inhibit bradykinin-induced calcium increase in pig aortic endothelial cells. Endothelium. 2002;9(2):103-8. **IF: 1,512**
- XV. Wagner L, Laczy B, Tamaskó M, Mazák I, Markó L, Molnár GA, Wagner Z, Mohás M, Cseh J, Fekete A, Wittmann I. Cigarette smoke-induced alterations in endothelial nitric

oxide synthase phosphorylation: role of protein kinase C. Endothelium. 2007;14(4-5):245-55. IF: 1,740

- XVI. Halmai R, Szijártó IA, Fehér E, Fésüs G, Molnár GA, Brasnyó P, Fülöp F, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. Cigarette smoke elicits relaxation of renal arteries. Eur J Clin Invest. 2011;41(2):195-202. IF: 3,018
- **XVII.** Halmai R, **Wittmann I.** Potential role of cigarette smoking in two emerging endemic diseases: chronic kideny disease and diabetes mellitus. Chapter 9. 123-154. In: Cigarette consumption and health effects. Ed: G. G. Chen; Nova Pulbishers, Hauppauge, NY, USA. 2013.
- XVIII. KÖZLÉSRE ELFOGADOTT, DE MÉG MEG NEM JELENT CIKK ELFOGADÓLEVELE:

--- On Fri, 11/16/12, submission@dustri.com <submission@dustri.com> wrote: From: submission@dustri.com <submission@dustri.com>

Subject: Manuscript accepted for publication (Manuscript_ID 107812 - 4)

To: halmair@yahoo.com

Cc: veronika.luger@dustri.de

Date: Friday, November 16, 2012, 4:55 PM

Dear Richard Halmai,

I am pleased to accept your interesting manuscript "Smoking as the potential link between Kimmelstiel-Wilson lesion and non-diabetic nodular glomerulosclerosis in male patients $\hat{a} \in \hat{}$ " a single center retrospective study" for publication in Clinical Nephrology.

It has been sent to the publishers and you should receive the galley proofs shortly thereafter.

Thank you for giving us the opportunity for publishing your work.

Yours sincerely,

Dr. Hartmut H. Malluche, MD, Professor and Chief

(Editor-in-Chief)

Peter Sawaya, MD, Professor of Medicine

(Deputy Editor)

Division of Nephrology, Bone and Mineral Metabolism Department of Internal Medicine University of Kentucky Medical Center 800 Rose St., Room MN 572 Lexington, KY 40536-0084 U S A Email: Kristina.stasko@uky.edu Phone: 859-323-2637

- XIX. Molnár G. A., Wagner Z., Markó L., Kőszegi T., Mohás M., Kocsis B., Matus Z., Wagner L., Tamaskó M., Mazák I., Laczy B., Nagy J., Wittmann I.: Urinary orthotyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int* 2005;68(5):2281-2287. IF: 4.927
- **XX.** Molnár A. G., Nemes V., Bíró Zs., Ludány A., Wagner Z., **Wittmann I.:** Accumulation of the hydroxil free radical markers meta-, ortho-tyrosine and DOPA in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free Radical Research* 2005;39(12):1359-1366. **IF: 2.323**

- XXI. Wittmann I., Nagy J.: Are insulin resistance and atherosclerosis the consequences of oxidative stress? *Diabetologia* 1996;39:1001-1003. (tudományos levél) IF: 5,376
- XXII. Wittmann I., Mazák I., Wagner L., Nagy J.: Possible role of free radicals generated by pseudohypoxia in the regulation of hepatic glucose output. An in vitro model using rat liver microsomal glucose 6-phosphatase. *Diabetologia* 1997;40:1251-1254. IF: 5,347
- XXIII. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. Br J Nutr. 2011;106(3):383-9. IF: 3,013
- XXIV. Nagy G, Gaszner B, Lányi É, Markó L, Fehér E, Cseh J, Kõszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I. Selective association of endogenous ouabain with subclinical organ damage in treated hypertensive patients. J Hum Hypertens. 2011;25(2):122-9. IF: 2,802
- XXV. Nagy G, Szijártó IA, Gaszner B, Lányi E, Markó L, Mérei A, Molnár GA, Németh K, Betlehem J, Wittmann I. Effects of mono- and dual blockade of the renin-angiotensin system on markers of cardiovascular status in hypertensive patients with mild and moderate renal failure. Kidney Blood Press Res. 2011;34(3):150-7. IF: 1,464

Disszertációban szereplő közlemények összesített impact factor-a: 55,751

A disszertációval kapcsolatos hazai magyar nyelvű folyóiratban megjelent közlemények időrendi sorrendben:

- **XXVI.** Wittmann I., Molnár M., J. Nagy, A felnőttkori diabeteses nephropathia kezelése. Diabetologia Hungarica 1996;S2:103-104.
- **XXVII. Wittmann I.:** A diabetes mellitus veseszövődményeinek fontosabb kérdései. Hippocrates 1999;5:315-318.
- **XXVIII.** Wittmann I., Wagner Z., Wagner L., Mazák I., Nagy J.: A nem-enzimatikus glikáció szerepe az öregedés, az atherosclerosis és a diabeteses nephropathia pathophysiológiájában és klinikai képének kialakulásában. (felkért összefoglaló) Diabetologia Hungarica 1999;7:9-21.
 - **XXIX. Wittmann I.,** Wagner Z., Pótó L., Wagner L., Mazák I., Nagy J.: Glikációs végtermékek kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. Orvosi Hetilap 1999;36:1997-2001.
 - **XXX. Wittmann I.,** Wagner Z., Pótó L., Wagner L., Mazák I., Nagy J.: Karbonil stressz-metabolitok kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. Orvosi Hetilap 1999;33:1841-1845.
 - **XXXI. Wittmann I.,** Nagy J.: Glikációs végtermékek újonnan felfedezett uraemiás toxinok? Javaslat új paraméter mérésére a dialízis effektivitásának ellenőrzésére. Hypertonia és Nephrologia 1999;3:303-305.
- **XXXII.** Nagy J., **Wittmann I.:** Nephropathia nem inzulindependens (2. típusú) diabetes mellitusban. Orvosi Hetilap 2000;12:609-614.
- XXXIII. Wittmann I., Wagner L., Pótó L., Wagner Z., Mazák I., Nagy J.: Kismolekulasúlyú karbonil stressz-termékek kimutatása diabetes mellitusban szenvedő betegek vizeletében. Magyar Belorvosi Archívum 2000;1:49-54.
- XXXIV. Wittmann I., Wagner Z., Mazák I., Holló Zs., Molnár M., Pótó L., Wagner L., Molnár G. A., Nagy J.: A genetikai prediszpozíció, a vas, az oxidatív stressz és a nem-enzimatikus glikáció szerepe a diabeteses albuminuria kialakulásában. Magyar Belorvosi Archívum 2001;54:204-209.
- **XXXV. Wittmann I.,** Wagner Z., Mazák I., Pótó L., Wagner L., Kovács T., Vas T., Molnár G. A., Nagy J.: A vesefunkció határozza meg az öregedést? Hypertonia és Nephrologia 2002;6: 222-227.
- XXXVI. Wagner Z., Mazák I., Schinzel R., Heidland A., Kientsch-Engel R., Wagner L., Nagy J., Wittmann I.: Az előrehaladott glikációs végtermékek szérumszintjének összefüggése a vesefunkcióval 2-es típusú diabetes mellitusban. Hypertonia és Nephrologia 2002;6:262-268.

- **XXXVII.** Wittmann I.: Új adatok a renin-angiotensin rendszer jelentőségéről a diabeteses nephropathia kialakulásában és kezelésében. Magyar Orvos 2002;12:36-38.
- XXXVIII. Vas T., Wagner Z., Kovács T., Wittmann I., Schinzel R., Heidland A., Kientsch-Engel R., Nagy J.: Nem enzimatikus glikáció és oxidatív stressz IgA-nephropathiában. Hypertonia és Nephrologia 2002;6:273-277.
 - XXXIX. Wittmann I., Degrell P., Komáromy A., Molnár G. A, Wagner W., Wagner L., Mazák I., Nagy J.: A renin-angiotenzin rendszer jelentősége a diabeteses nephropathia patogenezisében, klinikai képének kialakulásában és kezelésében. Orvosi Hetilap 2003;13:613-619
 - XL. Wittmann I. Wagner Z., Wagner L., Mazák I., Komáromy A., Molnár G. A., Gáti I., Melegh B., Nagy J.: Összefüggések az esszenciális hypertonia és a szénhidrát-anyagcsere zavara között. Hipotézis az angiotenzin II vasanyagcsere inzulin interakciónak a metabolikus syndroma kialakulásában játszott szerepéről. Diabetologia Hungarica 2003;11(1):15-21.
 - **XLI.** Bíró Zs., Nemes V., **Wittmann I.,** Molnár G. A., Kocsis B., Ludány A.: Szemlencsefehérjék elektroforetikus és nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás vizsgálata időskori cataractában. Szemészet 2003;140:67-72.
 - XLII. Wagner Z., Molnár G., A., Mazák I., Vas T., Wagner L., Tamaskó M., Laczy B., Nagy J., Wittmann I.: A nem-enzimatikus glikáció aterogén hatásának mechanizmusa diabetes mellitusban és veseelégtelenségben. Metabolizmus 2004;3:130-134.
 - XLIII. Wagner Z., Molnár G., Mazák I., Vas T., Wagner L., Tamaskó M., Laczy B., Nagy J., Wittmann
 L: Az előrehaladott glikációs végtermékek akkumulációja a vesefunkció-romlás, mint az ateroszklerózis rizikófaktora. Metabolizmus 2004;4:166-169.
 - **XLIV. Wittmann I.,** Soltész Gy., Jermendy Gy., Nagy J.: Az inzulinválasz első fázisának csökkenése szerepet játszhat az inzulin-rezisztencia kialakulásában. Orvosi Hetilap 2004;145(45):2267-2272.
 - XLV. Wittmann I., Markó L., Degrell P., Molnár G.A., Tamaskó M., Laczy B., Mohás M., Wagner Z., Wagner L., Nagy J.: A proteinuria nefronpusztuláshoz és ezáltal atherosclerosishoz vezet diabetes mellitusban. Focus Medicinae 2005;1:19-22.
 - XLVI. Wittmann I., Wagner L., Wagner Z., Molnár G. A., Tamaskó M., Laczy B., Markó L., Mohás M., Nagy J.: Cukorbetegek kóros albuminuriája mint cardiovascularis kockázati tényező. Lege Artis Medicinae 2005;15(12):891-894. (összefoglaló közlemény)
 - **XLVII. Wittmann I:** Az albuminuria és az előrehaladott glikációs végtermék-receptor (RAGE) szerepe az atherosclerosis kialakulásában. MOTESZ Magazin 2006;2:32-36.
 - XLVIII. Wittmann I, Molnár G A, Tamaskó M, Laczy B, Markó L, Mohás M, Cseh J, Wagner Z, Wagner L: A protein kináz C-β szelektív gátlásának jelentősége a diabeteszes microvascularis szövődmények kezelésében. Diabetologia Hungarica 2006;14:(4)13-18.
 - **XLIX.** Kovács T, Mikolás E, Szijártó I, Boros A G, **Wittmann I:** Vérnyomáscsökkentő gyógyszerek metabolikus hatásai és mellékhatásai: Granum 2007;10:(3)21-24.
 - L. Fülöp N, Degrell P, Pajor L, Chatham JC, Wittmann I: Nephropathia diabetica és oglikoziláció. Hypertonia és Nephrologia 2007;11:(6)320-325.
 - **LI. Wittmann I,** Wagner L, Markó L, Tamaskó M, Laczy B, Mohás M, Cseh J, Melegh B: A herediter haemochromatosis jelentősége a diabeteszes betegek gondozásában. Orvosi Hetilap 2007;148:(3)111-115.
 - **LII. Wittmann I,** Laczy B, Mikolás E, Markó L, Mohás M, Cseh J, Wagner L: A dohányzás inzulinrezisztenciát okoz és növeli a 2-es típusú diabetes mellitus, illetve a metabolikus syndroma kialakulásának kockázatát. Diabetologia Hungarica 2007;15:(4)305-311.
 - LIII. Wagner Z, Wagner L, Tamaskó M, Markó L, Mohás M, Cseh J, Wittmann I: A reninangiotenzin-rendszer patogenetikai szerepe az érkárosodás kialakulásában. Háziorvosi Továbbképző Szemle 2007;12:(1)47-51.
 - **LIV.** Wagner L, Bekő V, Wagner Z, Markó L, Mohás M, Nagy J, **Wittmann I:** Az anaemia korrekciójának jelentősége a diabeteses nephropathia komplex kezelésében. Háziorvosi Továbbképző Szemle 2007;13:(3)73-78.
 - LV. Markó L, Molnár G A, Wagner Z, Kőszegi T, Matus Z, Mohás M, Kuzma M, Szijártó I A,
 Wittmann I: Immunnefelometria és nagy teljesítményű folyadékkromatográfia a

microalbuminuria vizsgálatában. Újonnan javasolt határértékek vizsgálata. Orvosi Hetilap 2008;149:(2)59-67.

- **LVI.** Wagner Z, Molnár G A, Tamaskó M, Laczy B, Wagner L, Nagy J, **Wittmann I,** Molnár M, Csiky B: Hemodializált betegekben a szérum karboximetil-lizin-szint a mortalitás független prediktora. Magyar Orvos 2008;16:(4)36-40.
- LVII. Vas T, Markó L, Mohás M, Cseh J, Mikolás E, Szijártó I, Wittmann I: Cardiovascularis rizikócsökkenés vesebetegekben. Granum 2008;11:(4)17-22.
- **LVIII.** Nagy J, Kovács T, Vas T, Balázs E, Késői I, Pintér I, Sági B, **Wittmann I:** Metabolikus syndroma és a vesék. Hypertonia és Nephrologia 2008;12:(5)173-177.
 - LIX. Markó L, Szijártó I A, Cseh J, Kőszegi T, Szabó Z, Molnár G A, Matus Z, Mérei Á, Wittmann
 I: A HPLC-vel mérhető vizeletalbumin koncentrációja -80 °C-os tárolás során jelentősen csökken. Lehetséges mechanizmusok és következmények. Hypertonia és Nephrologia 2009;13:(2)88-93.
 - LX. Markó L, Mikolás E, Molnár G A, Wagner Z, Kőszegi T, Szijártó I A, Mohás M, Matus Z, Szabó Z, Böddi K, Mérei Á, Wittmann I: Normo- és microalbuminuriás cukorbetegekben a HPLC-vel mért vizeletalbumin-fluoreszcencia a vesefunkciós paraméterekkel függ össze, nem a glikémiás értékekkel. Diabetologia Hungarica 2009;17:(3)229-238.
- **LXI. Wittmann I:** A vesebetegségek kezelésének új megítélése. Magyar Belorvosi Archivum 2009;62:426-430.
- **LXII.** Jermendy Gy, Ádány R, Balogh S, Karádi I, Paragh Gy, Tulassay Zs, **Wittmann I:** Glikémiás kontroll 2-es típusú diabéteszben. Metabolizmus 2010;8:(4)226-231.
- LXIII. Nagy G, Gaszner B, Lányi É, Markó L, Fehér Er, Cseh J, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I: Az endogén ouabain összefügg a hypertoniás betegek cardiovasculáris állapotával. Magyar Belorvosi Archivum 2010;6:(63. évf.)435-442.
- LXIV. Wagner L, Laczy B, Cseh J, Tamaskó M, Mazák I, Markó L, Molnár G A, Wagner Z, Mohás M, Fekete A, Wittmann I: Cigarettafüst okozta elváltozások az endothelsejtekben. Hypertonia és Nephrologia 2010;14:(3)153-158.
- **LXV.** Késői I, Sági B, Vas T, Pintér T, Kovács T, **Wittmann I,** Nagy J: Cardiorenális syndromák. Orvosi Hetilap 2011;152:1520-1527.

9. Irodalomjegyzék

- 1. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KG. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. Diabetic Med. 2002;19(9):708-723.
- 2. Kahn S E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. Diabetologia. 2003;46(1):3-19.
- 3. Weyer C, Bogardus C, Mott D M, Pratly RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest. 1999;104(6):787-794.
- 4. Jensen C C, Cnop M, Hull R L, Fujimoto WY, Kahn SE; American Diabetes Association GENNID Study Group. Beta-cell function is the major determinant of oral glucose tolerance in four ethnic groups in the United States. Diabetes. 2002;51(7):2170-2178.
- 5. Kim F, Gallis B, Corson MA TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280(5):C1057-65.
- 6. Steinberg H O, Baron A D. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. Diabetologia. 2002;45(5):623-634.
- Steinberg HO Coupling of metabolism and cardiovascular response represents normal physiology. Clin Sci (Lond). 2003; 105(6):645-6.
- 8. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(5):816-823.
- 9. Salt I P, Morrow V A, Brandie F M, Connell JM, Petrie JR. High glucose inhibits insulin-stimulated nitric oxide production without reducing endothelial nitric-oxide synthase Ser phosphorylation in human aortic endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278(21):18791-18797.
- Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W, Henry W, Johnston D, McVeight GE. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus. Am J Hypertens. 2005;18(6):839-843.
- 11. Cutler RG. Antioxidants and aging. Am J Clin Nutr. 1991;53(1):373S-379S.
- 12. Hooper C. Free radicals: Research on biochemical bad boys comes of age. J NIH Res. 1989;1:101-106.
- 13. Halliwell R, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 1984;219(1):1-14.
- 14. Crane FL, Sun IL, Clark MG, Grebing C, Löw H. Transplazma-membrane redox system in growth and development. Biochim Biophys Acta. 1985;811(3):233-264.
- 15. Aruoma O. Eat, drink and be healthy. Chem Brit. 1996;32:29-31.
- Klebanoff SJ, Waltersdorph AM, Michel BR, Rosen H. Oxygen-based free radical generation by ferrous ions and deferoxamine. J Biol Chem. 1989;264(33):19765-19771.
- 17. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc. 1988;63(4):381-389.
- 18. Slater TF. Free radicals and tissue injury: fact and fiction. Br J Cancer Suppl. 1987;8:5-10.
- 19. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci. 1990;15(4):129-135.
- 20. Archer S Measurement of nitric oxide in biological models. FASEB J. 1993;7(2):349-360.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann Intern Med. 1994;120(3) 227-237.
- 22. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. Cell. 1994;78(6):931-936.
- 23. Puntarulo S, Cederbaum AI. Inhibition of ferritin-stimulated microsomal production of reactive oxygen intermediates by nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 1997;340(1):19-26.
- 24. Angelo M, Hausladen A, Singel DJ, Stamler JS. Interactions of NO with hemoglobin: from microbes to man. Methods Enzymol.2008;436:131-68.
- 25. Tomera JF. Nitric oxide: the interrelation of its actions. Drugs of Today. 1994;30:611-621.
- 26. 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):1-15.
- 27. Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxinitrite: footprints of peroxinitrite in vivo. Advances in Pharmacology. 1995;34:17-43.
- 28. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet. 1994;343(8907):1199-1206.
- Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA, Cornwell TL: cGMP signalling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. Advances in Pharmacology. 1995;34:305-322.
- 30. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. FASEB J. 1993;7(2):328-338.
- Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Buocher JL, Guissani A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. FASEB J. 1993;7(12):1124-1134.
- 32. Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. J Med Chem. 1995;38(22):4343-4362.
- 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.
- 34. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1983;23:239-257.
- 35. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. Free Radical Res Commun. 1993;18(4):195-199.
- 36. Ryan TP, Aust SD. The role of iron in oxygen-mediated troxicities. Crit Rev Toxicol. 1992;22(2):119-141.
- 37. Galey JB. Potential use of iron chelators against oxidative damage. Advances in Pharmacology. 1997;38:167-203.

- 38. Puntarulo S, Cederbaum AI. Ferritin dependent inactivation of microsomal glucose-6-phosphatase. Biochim Biophys Acta. 1994;1200(1):41-47.
- 39. Okayama N, Kevil CG, Correia L, Jourd'heuil D, Itoh M, Grisham MB, Alexander JS. Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro. Am J Physiol. 1997;273(5 Pt 1):C1581-7.
- 40. Nishikawa, T, Edelstein, D, Du, XL, Yamagishi, S, Matsumura, T, Kaneda, Y, Yorek, MA, Beebe, D, Oates, PJ, Hammes, HP, Giardino, I, Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature. 2000;404(6779):787-790.
- 41. Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(8):1551-1557.
- 42. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C. Role of nitrosative stress and peroxinitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. Curr Med Chem. 2005;12(3):267-275.
- 43. Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications. Is it time to treat? Diabetes. 2005;54(1):1-7.
- 44. Ceriello A, Assaloni R, D Ros R, Maier A, Quagliaro L, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Effect of irbesartan on nitrotyrosine generation in non-hypertensive diabetic patients. Diabetologia. 2004;47(9):1535-1540.
- 45. Ceriello A, Motz E, Cavarape A, Lizzio S, Russo A, Quatraro A, Giugliano D. Hyperglycemia counterbalances the antihypertensive effect of glutathione in diabetic patients: Evidence linking hypertension and glycemia through the oxidative stress in diabetes mellitus. J Diabetes Complications. 1997;11(4):250-255.
- 46. Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. Role of hemochromatosis. C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy. Diabetes Care. 2001;24(7):1178-1191.
- 47. Ferrannini E. Insulin resitance, iron, and the liver. Lancet. 2000;355(9222):2181-2182.
- 48. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. Diabetes. 1997;46 Suppl 2:S9-S13.
- 49. Bertelsen M, Anggard EE, Carrier MJ. Oxidative stress impaires insulin internalization in endothelial cells in vitro. Diabetologia. 2001; 44(5):605-613.
- 50. Zheng H, Cable R, Spencer B, Votto N, Katz SD. Iron stores and vascular function in voluntary blood donors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(8):1577-1583.
- Ishizaka N, Saito K, Mori I, Matsuzaki G, Ohno M, Nagai R. Iron chelation suppresses ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(11):2282-2288.
- 52. Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. Circulation. 2000;101(18):2206-2212.
- Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation. A firm link to endothelial cell dysfunction. Circ Res. 2004;95(3);233-238.
- 54. Nakayama M, Inoguchi T, Sonta T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Tsubouchi H, Sonoda N, Kobayashi K, Sumimoto H, Nawata H. Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. Biochem Biophys Res Commun. 2005;332(4):927-933.
- 55. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. Hypertension. 2001;37(4):1053-1059.
- 56. Pratico D. Antioxidants and endothelium protection. Atherosclerosis. 2005;181(2):215-224.
- 57. Jermendy Gy. Can type 2 diabetes mellitus be considered preventable? Diabetes Res Clin Pract. 2005. 68 Suppl 1: S73-S81.
- Abuissa H, Bell DSH, O'Keefe JH JR. Strategies to prevent type 2 diabetes. Curr Med Res Opin. 2005;21(7):1107-1114.
- 59. Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME. Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes? J Hypertens 2005;23(3):463-473.
- 60. Danesh FR, Kanwar YS. Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. FASEB J. 2004;18(7):805-815.
- Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Pravastatin and the development of diabetes mellitus. Evidence for a protective treatment effect int he West of Scotland Coronary Prevention Study. Circulation. 2001;103(3):357-362.
- 62. Balla G, Vercelotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. Lab Invest. 1991;64(5):648-655.
- 63. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990;280(1): 1-8.
- 64. Ozhogina OA, Kasaikina OT. Beta-carotene as an interceptor of free radicals. Free Radical Biol Med. 1995;19(5): 575-581.
- 65. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Radical Res Commun. 1989;6(1):67-75.
- 66. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant? Free Radical Res Commun. 1990;9(1):1-31.
- 67. Svardal AM, Mansoor MA, Ueland PM. Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography. Anal Biochem. 1990;184(2):338-346.

- Nuttall SL, Martin U, Sinclair AJ, Kendall MJ. Glutathione: in sickness and in health. Lancet. 1998;351(9103): 645-646.
- Karlsson K, Marklund SL. Plasma clearance of human extracellular superoxide dismutase in rabbits. J Clin Invest. 1988;82(3):762-766.
- 70. Pascoe GA, Reed DJ. Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. Free Radical Biol Med. 1989;6(2):209-224.
- 71. Schraufstaetter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG. Glutathione cycle activity and pyridine nucleotide levels in oxidant-induced injury of cells. J Clin Invest. 1985;76(3):1131-1139.
- 72. Oberley TD, Schultz JL, Li N, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. Free Radical Biol Med. 1995;19(1):53-65.
- Starke PE, Farber JL. Endogenous defense against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. J Biol Chem. 1985;260(1):86-92.
- 74. Maillard LC. Synthese des matieres humiques par action des acides amines sur les sucres reducteurs. Ann Chim. 1916;5:258-317.
- 75. Mohammad A, Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. The "browning" reaction of proteins with glucose. Arch Biochem. 1949;24(1):157-178.
- 76. Johnson JA, Miller BS. Browning of baked products. Baker's Dig. 1961;35:52-59.
- 77. Rothe M, Thomas B. Über Bildung, Zusammensetzung und Bestimmung von Aromastoffen des Brotes. Die Nahrung. 1959;3:1-17.
- Linko Y-Y, Johnson JA. Changes in amino acides and formation of carbonil compounds during baking. J Agr Food Chem. 1963;11:150-152.
- 79. Goering KJ, Brelsford DL. New starches. I. The unusual properties of the starch from Saponaria vaccaria. Cereal Chem. 1966;43:127-136.
- Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Biochem J. 1993;291(PT 2):529-535.
- Wagner Z, Wittmann I, Pótó L, Wagner L, Belágyi J, Nagy J. Glukóz szabad gyök képződése hidroxil szabad gyök jelenlétében. Diabetologia Hungarica. 1999;4:205-211.
- 82. 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(11):1820-1825.
- 83. Niawa T. Beta2-microglobulin dialysis amyloid and its formation: Role of 3-deoxyglucosone and advanced glycation end products. Nephron. 1997;76(4):373-391.
- McLaughlin JA, Pethig R, Szent-Györgyi A. Spectroscopic studies of the protein-methylglyoxal adduct. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77(2):949-951.
- 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.
- Elgawish A, Glomb M, Friedlander M, Monnier VM. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. J Biol Chem. 1996;271(22):12964-12971.
- Requena JR, Ahmed MU, Fountain CW, Degenhardt TP, Reddy S, Perez C, Lyions TJ, Jenkins AJ, Baynes JW, Thorpe SR. Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the Maillard reaction in vivo. J Biol Chem. 1997; 272(28):17473-17479.
- Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. J Clin Invest. 1997;99(3):457-468.
- Peters AL, Davidson MB, Schringer DL, Hasselblad V. A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels. JAMA. 1996;276(15):1246-1252.
- 90. Kilpatrick ES, Maylor PW, Keevil BG. Biological variation of glycated hemoglobin. Diabetes Care. 1998;21(2):261-264.
- Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase, F, Tatemichi N, Takei Y. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. J Clin Invest. 1997;99(6):1272-1280.
- Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersele de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. Immunohistochemical colocalisation of glycoxidation products and lipidperoxidation products in diabetic renal glomerular lesions. J Clin Invest. 1997;100(12):2995-3004.
- Bendayan M. Immunocythochemical detection of advanced glycated end products in rat renal tissue as a function of age and diabetes. Kidney Int. 1998;54(2):438-447.
- 94. Dolhofer-Bliesener R, Lechner B, Deppisch R, Ritz E, Gerbitz KD. Immunological determination of advanced glycosylation end-products in human blood and urine. Nephrol Dial Transplant. 1995;10(5):657-664.
- 95. Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceutics to reduce AGE accumulation. Curr Med Chem. 2004;11(20):2767-2784.
- 96. Jones AF, Lunec J. Protein fluorescence and its relationship to free radical activity. Br J Cancer. 1987;8:60-65.
- 97. Le Guen CA, Jones AF, Barnett AH, Lunec J Role of reactive oxygen species in the generation of fluorescence by glycation. Ann Clin Biochem. 1992;29 (Pt 2):184-9.
- 98. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes. 1991;40(4):405-412.
- 99. Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. Curr Opin Lipidol. 1997;8(3):174-180.
- 100. Gutteridge JM. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. FEBS. Lett. 1981;128(2):343-346.

- 101. King TP. Selective chemical modification of arginyl residues. Biochemistry. 1966;5(11):3454-3459.
- 102. Koschinsky T, He C-J, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(12):6474-6479.
- 103. Nagy J, Demaster EG, Wittmann I, Schultz P, Raij L. Induction of endothelial cell injury by cigarette smoke. Endothelium. 1997;5(4):251-263.
- 104. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(25):13915-13920.
- 105. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. J Clin Invest. 1997;99(3):457-468.
- 106. Dolhofer-Bliesener R, Lechner B, Gerbitz KD.Possible significance of advanced glycation end products in serum in end-stage renal disease and in late complications of diabetes.Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996;34(4):355-61.
- 107. Verbeke P, Perichon M, Borot-Laloi C, Schaeverbeke J, Bakala H. Accumulation of advanced glycation endproducts in the rat nephron: link with circulation AGEs during aging. J Histochem Cytochem. 1997;45(8):1059-1068.
- 108. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: bichemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. J Lab Invest. 1994;70(2):138-151.
- 109. Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. Diabetes. 1997;46 Suppl 2:S19-S25.
- 110. Smedsrod B, Melkko J, Araki N, Sano H, Horiuchi S. Advanced glycation end products are eliminated by scavanger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. Biochem J. 1997;322 (Pt 2):567-573.
- 111. Melkko J, Hellevik T, Risteli L, Risteli J, Smedsrod B. Clearance of NH2-terminal propeptides of type I and III procollagen is a physiological function of the scavanger receptor in liver endothelial cells. J Exp Med. 1994;179(2):405-412.
- 112. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley V, Clauss M. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosilation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. J Biol Chem. 1992;267(21):14987-14997.
- 113. Takata K, Horiuchi S, Araki N, Shiga M, Saitoh M, Morino Y. Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavanger receptor for aldehyde-modified proteins. J Biol Chem. 1988;263(29):14819-14825.
- 114. Silberstein S, Kelleher DJ, Gilmore R. The 48-kDa subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase complex is homologous to the essential yeast protein WBP1. J Biol Chem. 1992;267(33):23658-23663.
- 115. Patel J, Kligman D. Purification and characterization of an Mr 87,000 protein kinase C substrate from rat brain. J Biol Chem. 1987;262(34):16686-16691.
- 116. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A. Identification of galectin-3 as a high affinity binding protein for advanced glycation endproducts (AGE), a new member of the AGE-receptor complex. Mol Med. 1995;1(6):634-646.
- 117. Vlassara H. Protein glycation in the kidney.: Role in diabetes and aging. Kidney Int. 1996;49(6):1795-1804.
- 118. Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, Sernau T, Wahl P, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. Nephrol Dial Transplant. 1995;10(9):1662-1667.
- 119. Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A, Ziegler R, Schmidt AM, Waldherr R, Wahl P, Stern DM, Nawroth PP. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. Am J Pathol. 1995;146(3):688-694.
- 120. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21^{ras}-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. J Biol Chem. 1997;272(28):17810-17814.
- 121. Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A. p21^{ras} as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redoc stress. J Biol Chem. 1995;270(36):21195-21198.
- 122. Palmer H, Paulson KE. Reactive oxigen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. Nutr Rev. 1997;55(10):353-361.
- 123. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. J Biol Chem. 1997;272(26):16498-16506.
- 124. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Müller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP. Advanced glycation end product-induced activation of NF-κB is suppressed by α-lipoic acid in cultured endothelial cells. Diabetes. 1997;46(9):1481-1490.
- 125. Szwergold BS. Intrinsic toxicity of glucose, due to non-enzymatic glycation, is controlled in vivo by deglycation systems including: FN3K-mediated deglycation of fructosamines and transglycation of aldosamines. Med Hypothesis. 2005;65(2):337-348.
- 126. Collard F, Wiame E, Bergans N, Fortpied J, Vertommen D, Vanstapel F, Delpierre G, Van Schafting E. Fructosamine 3-kinase-related protein and deglycation in human erythrocytes. Biochem J. 2004;382(Pt 1):137-143.

- 127. Conner JR, Beisswenger PJ, Szwergold BS. The expression of the genes for fructosamine-3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein appears to be constitutive and unaffected by environmental signals. Biochem Biophys Res Comm. 2004;323(3):932-936.
- 128. Delplanque J, Delpierre G, Opperdoes FR, Van Schafting E. Tissue distribution and evolution of fructosamine 3-kinase and fructosamine 3-kinase-related protein. J Biol Chem. 2004;279(45):46606-46613.
- 129. Szwergold BS, Howell SK, Beisswenger PJ. Transglycation a potential new mechanism for deglycation of Schiff's bases. Ann N Y Acad Sci. 2005;1043:845-864.
- 130. Vlassara H, Fuh H, Donelly T, Cybulsky M. Advanced glycation end products promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. Mol Med. 1995;1(4):447-456.
- 131. Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, Ebina Y, Makino H, Smedsrod B, Horiuchi S. Insulin enhances macrophage scavanger receptor-mediated endocytotic uptake of advanced glycation end products. J Biol Chem. 1998;273(15):8630-8637.
- 132. Hori O, Yan SD, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant. 1996;11 Suppl 5:13-16.
- 133. Vlassara H, Bucala R. Recent progresses in advanced glycation and diabetic vascular disease. Role of advanced glycation end product receptors. Diabetes. 1996;45 Suppl 3:S65-S66.
- 134. Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier J-L, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D. RAGE A novel cellular receptor for advanced glycation end products. Diabetes. 1996;45 Suppl 3:S77-S80.
- 135. Gugliucci A, Bendayan M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): Evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. Diabetologia. 1996;39(2):149-160.
- 136. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Renal catabolism of advanced glycation end products: The fate of pentosidine. Kidney Int. 1998;53(2):416-422.
- 137. Yang C-W, Vlassara H, Peten EP, He C-J, Striker GE, Striker LJ. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(20):9436-9440.
- 138. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(24):11704-11708.
- 139. Túri S, Németh I, Torkos A, Saghy L, Varga I, Matkovics B, Nagy J. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. Free Rad Biol Med. 1997;22(1-2):161-168.
- 140. Prakash M, Upadhya S, Prabhu R. Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uremia. Scand J Clin Lab Invest. 2004;64(6):599-604.
- 141. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. Kidney Int. 2004;66(5):1988-1993.
- 142. Annuk M. Which marker is informative in characterizing the level of oxidative stress in ESRD patients? Nephron Clin Pract. 2004;98(1):c1-c2.
- 143. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, Cardoso C, Noel LH, Guérin AP, London GM, Jungers P. Early prediction of IgA nephropathy progression: Proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. Kidney Int. 2004;66(4):1606-1612.
- 144. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, London GM, Jungers P. Advanced oxidation products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. Am J Kidney Dis. 2005;45(1):39-47.
- 145. Jung HH, Choi DH, Lee SH. Serum melondialdehyde and coronary artery disease in hemodialysis patients. Am J Nephrol. 2004;24(5):537-542.
- 146. Kuo H-T, Kuo M-C, Chiu Y-W, Chang J-M, Guh J-Y, Chen H-C. Increased glomerular and extracellular malondialdehyde levels in patients and rats with focal segmental glomerulosclerosis. Eur J Clin Invest. 2005;35(4):245-250.
- 147. Mitrogianni Z, Barbouti A, Galaris D, Siamopoulos KC. Tyrosine nitration in plasma proteins from patients undergoing hemodialysis. Am J Kidney Dis. 2004;44(2):286-292.
- 148. Anraku M, Kitamura K, Shinohara A, Adachi M, Suenaga A, Maruyama T, Miyanaka K, Miyoshi T, Shiraishi N, Nonoquchi H, Otagiri M, Tomita K. Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. Kidney Int. 2004;66(2):841-848.
- 149. Leehey DJ, Palubiak DJ, Chebrolu S, Agarwal R. Sodium ferric gluconate causes oxidative stress but not akute renal injury in patients with chronic kidney disease: a pilot study. Nephrol Dial transplant. 2005;20(1):135-140.
- 150. Gonin JM. Folic acid supplementation to prevent adverse events in individuals with chronic kidney disease and end stage renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2005;14(3):277-281.
- 151. Simmons EM, Langone A, Sezer MT, Vella JP, Recupero P, Morrow JD, Ikizler TA, Himmelfarb J. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. Transplantation. 2005;79(8):914-919.
- 152. Massy ZA, Maziere C, Kamel S, Brazier M, Choukroun G, Tribouillon C, Slama M, Andrejak M, Maziére JC. Impact of inflammation and oxidative stress on vascular calcifications in chronic kidney disease. Pediatr Nephrol. 2005;20(3):380-382.
- 153. Gordon CA, Himmelfarb J. Antioxidant therapy in uremia: evidence-based medicine? Semin Dial. 2004;17(5):327-332.
- 154. Wang SX, Mené P, Holthöfer H. Nephrin mRNA regulation by protein kinase C. J Nephrol. 2001;14(2):98-103.

- 155. Toyoda M, Suzuki D, Umezono T, Uehara G, Maruyama M, Honma M, Sakai T, Sakai H. Expression of human mRNA in diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2004;19(2):380-385.
- 156. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, Camussi G. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy. Evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. Diabetes. 2003;52(4):1023-1030.
- 157. Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthöfer H, Zaoui P, Pinel N, Cordonnier DJ, Gilber RE. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephri, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. Diabetologia. 2002;45(11):1572-1576.
- 158. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertensio. Diabetologia. 2001;44(7):874-877.
- 159. Anjaneyulu M, Chopra K. Effet of irbesartan on the antioxidant defence system and nitric oxide release in diabetic rat kidney. Am J Nephrol. 2004;24(5):488-496.
- 160. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, Wilcox CS. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. Kidney Int. 2005;67(5):1890-1898.
- 161. Hales CN. Suicide of the nephron. Lancet. 2001;357(9250):136-137.
- 162. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE. Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group: Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population.Circulation. 2002;106(14):1777-1782.
- 163. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. Ann Intern Med. 2004;140(3):167-174.
- 164. El-Atat FA, Stas SN, McFarlane SI, Sowers JR. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. J Am Soc Nephrol. 2004;15(11):2816-2827.
- 165. Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarrette smoke and its toxicological implications. Environmental Health Perspectives. 1985;64:111-126.
- 166. Pryor WA, Tamura M, Church DF. An ESR spin trapping study of the radicals produced in NOx/olefin reactions. A mechanism for the production of the apperently long-lived radicals in gas-phase cigarette smoke. J Am Chem Soc. 1984;106:5073-5079.
- 167. Pittilo RM. Cigarette smoking and endothelial injury: a review. Adv Exp Med Biol. 1990;273:61-78.
- 168. Davis JW. Some acute effects of smoking on endothelial cells and platelets. Adv Exp Med Biol. 1990;273:107-118.
- 169. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. 1999;399(6736):601–605.
- 170. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca2+ but requires phospyorylation by Akt at Ser (1179). J Biol Chem. 2001;276(32):30392–30398.
- 171. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. Circ Res. 2001;88(11):E68–75.
- 172. Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. J Biol Chem. 2002;277(8):6017–6024.
- 173. Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, and Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem. 2001;276(21):17625–17628.
- 174. Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. J Biochem. 2003;133(6):773–781.
- 175. Boo YC, Soerscu G, Boyd N, Shiojimas I, Walsh K, Du J, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. J Biol Chem 2002;277(5):3388–3396.
- 176. Bae SW, Kim HS, Cha YN, Park YS, Jo SA, Jo I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2003;306(4):981– 987.
- 177. Westwood ME, Thornalley PJ. Glycation and advanced glycation endproducts, in Colaco C (ed.): The glycation hypothesis of atherosclerosis, chap 3. Austin, TX, Landes. Bioscience. 1997;pp 57-87. 165
- 178. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. Diabetes. 1999;48(1):1-9.
- 179. Fu S, Fu MX, Baynes JW, Thorpe SR, Dean RT. Presence of dopa and amino acid hydroperoxides in proteins modified with advanced glycation end products (AGEs): amino acid oxidation products as a possible source of oxidative stress induced by AGE proteins. Biochem J. 1998;330 (Pt 1):233-9.
- Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81(2):583-587.
- 181. Odetti P, Pronzato MA, Noberasco G, Cosso L, Traverso N, Cottalasso D, Marinari UM. Relationships between glycation and oxidation related fluorescence in rat collagen during aging - an in vivo and in vitro study. Lab Invest. 1994;70(1):61-67.
- 182. Monnier VM, Sell DR, Miyata S, Nagaraj RH, Odetti P, Lapolla A. Advanced Maillard reaction products as markers for tissue damage in diabetes and uremia: Relevance to diabetic nephropathy. Acta Diabetol. 1992;29:130-135.

- 183. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Biology of disease. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Lab Invest. 1994;70(2):138-151.
- 184. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N^ε-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. J Clin Invest. 1997;99(3):457-468.
- 185. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fushegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. Metabolism. 1998;47(11):1348-1353.
- 186. Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, DeOreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM. Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. Kidney Int. 2000;57(6):2571-2585.
- 187. Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, Tanaka H, Maeda K, Kawashima S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: An advanced glycation end product. J Am Soc Nephrol. 1998;9(9):1681-1688.
- 188. Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uremia and treatment of renal failure. Lancet. 1994;343(8912):1519-1522.
- 189. Dawnay A, Millar DJ. The pathogenesis and consequences of AGE formation in uraemia and its treatment. Cell Mol Biol. 1998;44(7):1081-1094.
- 190. Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, DeOreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM. Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. Kidney Int. 2000;57(6):2571-2585.
- 191. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron. 1976;16(1):31-41.
- 192. Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Schinzel R. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997;35(9):669-677.
- 193. Mellinghoff AC, Reininger AJ, Wuerth JP, Founds HW, Landgraf R, Hepp KD. Formation of plasma advanced glycation end products (AGEs) have no influence on plasma viscosity. Diabetic Med. 1997;14(10):832-836.
- 194. al-Abed Y, Kapurniotu A, Bucala R. Advanced glycation end products: detection and reversal. Methods Enzymol. 1999;309:152-172.
- 195. Delpierre G, Collard F, Fortpied J, Van Schaftingen E. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. Biochem J. 2002;365(Pt 3):801-808.
- 196. Delpierre G, Van Schaftingen E. Fructosamine 3-kinase, an enzyme involved in protein deglycation. Biochem Soc Trans. 2003;31(Pt 6):1354-1357.
- 197. Szwergold BS, Beisswenger PJ. Enzymatic deglycation--a new paradigm or an epiphenomenon? Biochem Soc Trans. 2003;31(Pt 6):1428-1432.
- 198. Szwergold BS, Howell S, Beisswenger PJ. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. Diabetes. 2001;50(9):2139-2147.
- 199. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Lab Invest. 1994;70(2):138-151.
- 200. Delpierre G, Vertommen D, Communi D, Rider MH, Van Schaftingen E. Identification of fructosamine residues deglycated by fructosamine-3-kinase in human hemoglobin. J Biol Chem. 2004;279(26):27613-27620.
- 201. Collard F, Delpierre G, Stroobant V, Matthijs G, Van Schaftingen E. A mammalian protein homologous to fructosamine-3-kinase is a ketosamine-3-kinase acting on psicosamines and ribulosamines but not on fructosamines. Diabetes. 2003;52(12):2888-2895.
- 202. Conner JR, Beisswenger PJ, Szwergold BS. The expression of the genes for fructosamine-3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein appears to be constitutive and unaffected by environmental signals. Biochem Biophys Res Commun. 2004;323(3):932-936.
- 203. Veiga da-Cunha M, Jacquemin P, Delpierre G, Godfraind C, Théate I, Vertommen D, Clotman F, Lemaigre F, Devuyst O, Van Schaftingen E. Increased protein glycation in fructosamine 3-kinase-deficient mice. Biochem J. 2006;399(2):257-264.
- 204. Delpierre G, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Buysschaert M, Van Schaftingen E. Variability in erythrocyte fructosamine 3-kinase activity in humans correlates with polymorphisms in the FN3K gene and impacts on haemoglobin glycation at specific sites. Diabetes Metab. 2006;32(1):31-39.
- 205. Jenette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. Heptinstall's Pathology of the Kidney. Lippincott-Raven, Philadelphia New York, 952-995, 1998.
- 206. Emonnot L, Cohen R, Lo M. Renal and metabolic disorders depend on the renin-angiotensin system in Lyon hypertensive rats associated with diabetes. Am J Hypertens. 2008;21(6):657-62.
- 207. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(6865):813-820.
- 208. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. J Biol Chem. 1991;266:4706-4712.
- 209. Kornfeld R. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. J Biol Chem. 1967;242(13):3135-3141.
- 210. Fulop N, Mason MM, Dutta K, Wang P, Davidoff AJ, Marchase RB, Chatham JC. The impact of Type-2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-Linked N-acetylglucosamine levels in the heart. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(4):C1370-8.

- 211. Yki-Jarvinen H, Daniels MC, Virkamaki A, Makimattila S, DeFronzo RA, McClain D. Increased glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in skeletal muscle of patients with NIDDM. Diabetes. 1996;45(3):302-307.
- 212. Srinivasan V, Sandhya N, Sampathkumar R, Farooq S, Mohan V, Balasubramanyam M. Glutamine fructose-6phosphate amidotransferase (GFAT) gene expression and activity in patients with type 2 diabetes: Interrelationships with hyperglycaemia and oxidative stress. Clin Biochem. 2007;40(13-14):952-957.
- 213. Zachara NE, Hart GW. The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. Chem Rev. 2002;102(2):431-438.
- 214. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. J Clin Invest. 2001;108(9):1341-1348.
- 215. Zachara NE, Hart GW. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. Biochim Biophys Acta. 2004;1673(1-2):13-28.
- 216. Han I, Roos MD, Kudlow JE. Interaction of the transcription factor Sp1 with the nuclear pore protein p62 requires the C-terminal domain of p62. J Cell Biochem. 1998;68(1):50-61.
- 217. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. Circulation. 2002;106(4):466-472.
- 218. Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. Mol Cell Biol.1997;17(11):6472-6480.
- 219. Duverger E, Roche AC, Monsigny M. N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. Glycobiology. 1996;6(4):381-386.
- 220. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290(1):E1-E8.
- 221. Fulop N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. Cardiovasc Res. 2007;73(2):288-297.
- 222. Masson E, Lagarde M, Wiernsperger N, El Bawab S. Hyperglycemia and glucosamine-induced mesangial cell cycle arrest and hypertrophy: Common or independent mechanisms? IUBMB Life. 2006;58(7):381-388.
- 223. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. Kidney Int Suppl. 2000;77:S13-18.
- 224. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. J Clin Invest 1998; 101(1):160-169.
- 225. Weigert C, Friess U, Brodbeck K, Haring HU, Schleicher ED. Glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase enzyme activity is necessary for the induction of TGF-beta1 and fibronectin expression in mesangial cells. Diabetologia 2003;46(6):852-855.
- 226. James LR, Fantus IG, Goldberg H, Ly H, Scholey JW. Overexpression of GFAT activates PAI-1 promoter in mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2000;279(4):F718-727.
- 227. Hsieh TJ, Fustier P, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Fantus IG, Hamet P, Chan JS. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. Endocrinology. 2003;144(10):4338-4349.
- 228. Nerlich AG, Sauer U, Kolm-Litty V, Wagner E, Koch M, Schleicher ED. Expression of glutamine:fructose-6phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. Diabetes. 1998;47(2):170-178.
- 229. Julian BA. IgA nephropathy and related disorders. In: Greenberg A (ed): Primer on Kidney Diseases (Third edition), San Diego, San Francisco, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Academic Press. 2001;pp.165-171.
- 230. Floege J, Feehally J. IgA nephropathy: Recent developments. J Am Soc Nephrol. 2000;11(12):2395-2403.
- 231. Fliser D, Pacini G, Engeletter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, Ritz E. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. Kidney Int. 1998;53(5):1343-1347.
- 232. Kato Y, Hayaski M, Ohno Y, Suzawa T, Sasaki T, Sarurta T. Mild renal dysfunction is associated with insulin resistance in chronic glomerulonephritis. Clin Nephrol 2000;54(5):366-373.
- 233. Mak SK, Wong PN, Lo KY, Tong GM, Wong AK. Prospective study on renal outcome of IgA nephropathy superimposed on diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetic patients. Nephrol Dial Transplant. 2001;16(6), 1183-1188.
- 234. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. Free Radic Biol Med. 1996;20(2):251-256.
- 235. Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. Kidney Int 1987;31:673-689.
- 236. Comper WD, Jerums G, Osicka TM. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and highperformance liquid chromatography. Clin Biochem. 2004;37(2):105-111.
- 237. Comper WD, Osicka TM, Jerums G. High prevalence of immuno-unreactive intact albumin in urine of diabetic patients. Am J Kidney Dis. 2003;41(2):336-342.
- 238. Osicka TM, Comper WD. Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. Clin Chem. 2004;50(12):2286-2291.
- Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. Science. 1981;211(4481):491-493.

- 240. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. Metabolism. 1998;47(11):1348-1353.
- 241. Gerdemann A, Wagner Z, Solf A, Bahner U, Heidland A, Vienken J, Schinzel R. Plasma levels of advanced glycation end products during haemodialysis, haemodiafiltration and haemofiltration: potential importance of dialysate quality. Nephrol Dial Transplant. 2002;17(6):1045-1049.
- 242. Méndez JD, Xie J, García-Pérez E. Urea inhibits the in vitro formation of fluorescent advanced glycation end products. World Appl Sci J. 2007;2(2):090-098.
- 243. Westwood ME, Thornalley PJ. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. J Protein Chem. 1995;14(5):359-372.
- 244. Brinkman JW, Heerspink HL, de Zeeuw D, Gansevoort RT, Bakker SJ. Urinary pH affects albumin concentrations after prolonged frozen storage. Nephrol Dial Transplant. 2007;22(12):3670.
- 245. Schurek HJ. Mechanisms of glomerular proteinuria and haematuria. Kidney Int Suppl. 1994;47:S12-16.
- 246. Mouradian JA, Sherman RL. Passage of an erythrocyte through a glomerular basement membrane gap. New Engl J Med. 1975;293(18):940-941.
- 247. Rath B, Turner C, Hartley B, Chantler C. What makes red cells dysmorphic in glomerular haematuria? Pediatr Nephrol. 1992;6(5):424-427.
- 248. Coppo R, Camilla R, Amore A, Peruzzi L. Oxidative stress in IgA nephropathy. Nephron Clin Pract. 2010;116(3):c196-8.
- 249. Glomb MA, Tschirnich R. Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. J Agric Food Chem. 2001;49(11):5543-5550.
- 250. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. Biochem J. 1999;344(Pt 1):109-116.
- 251. Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. Toxicol Lett. 1999;110(3):145-175.
- 252. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. J Am Soc Nephrol. 1999;10(4):822-832.
- 253. Oya T, Hattory N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida, K. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. J Biol Chem. 1999;274(26): 18492-18502.
- 254. Westwood ME, McLellan AC, Thornalley PJ. Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin. Competition with advanced glycation end product-modified serum albumin at the advanced glycation end product receptor. J Biol Chem. 1994;269(51):32293-32298.
- 255. Shamsi FA, Partal A, Sady C, Glomb MA, Nagaraj RH. Immunological evidence for methylglyoxal-derived modifications in vivo. Determination of antigenic epitopes. J Biol Chem. 1998;273(12):6928-6936.
- 256. Yim H-S, Kang S-O, Hah Y-C, Chock PB, Yim MB. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. J Biol Chem. 1995;270(47):28228-28233.
- 257. Elgawish A, Glomb M, Friedlander M, Monnier MV. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. J Biol Chem. 1996;271(22):12964-12971.
- 258. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson JM. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. Biochem J. 1993;291(Pt 2):529-535.
- 259. 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(11):1820-1825.
- 260. Puntarulo S, Cederbaum AI. Role of cytochrom P-450 in the stimulation of microsomal production of reactive oxygen species by ferritin. Biochim. Biophys Acta. 1996;1289(2):238-24624.
- Breuer W, Epsztejn S, Cabantchik ZI. Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron (II). J Biol Chem. 1995;270(41):24209-24215.
- 262. Harrison DG. Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest. 1997;100(9):2153-2157.
- 263. Chowienczyk P, Ritter J. Arginine: NO more than a simple aminoacid? Lancet. 1997;350(9082):901-902.
- 264. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem. 1985;265:3440-3450.
- 265. Ritz E, Deppisch R, Nawroth PP. Toxicity of uraemia does it come of AGE? Nephrol Dial Transplant. 1994;9(1):1-2.
- 266. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res. 1998;37(3):586-600.
- 267. Raj DSC, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: A nephrologist's perspective. Am J Kidney Dis. 2000;35(3):365-680.
- 268. Suliman ME, Heimbürger O, Bárány P, Anderstam B, Pecoits-Filho R, Rodríguez Ayala E, Qureshi AR, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P. Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in endstage renal disease patients starting on dialysis therapy. J Am Soc Nephrol. 2003;14(6):1614-1622.

- 269. Schwedler SB, Metzger T, Schinzel R, Wanner C. Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. Kidney Int. 2002;62(1):301-310.
- 270. Stein G, Busch M, Müller A, Wendt T, Franke C, Niwa T, Franke S. Are advanced glycation end products cardiovascular risk factors in patients with CRF? Am J Kidney Dis. 2003;41(3 Suppl.1):S52-S56.
- 271. Busch M, Franke S, Müller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, Niwa T, Stein G. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. Kidney Int. 2004; 66(1), 338-347.
- 272. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-275.
- 273. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehydeby means of the Hantzsch reaction. Biochem J. 1953;55(3): 416-421.
- 274. Schnitzer JE. The endothelial cell surface and caveolae in health and disease. In: Bom GVR and Schwartz CJ (eds) Vascular Endothelium. Physiology, pathology, and therapeutic opportunities. Schattauer Stuttgart-New York, 1997; 77-95.
- 275. Michel T, Feron. Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? J Clin Invest. 1997;100(9):2146-2152.
- 276. Fujimoto T, Hagiwara H, Aoki T, Kogo H, Nomura R. Caveolae: from a morphological point of view. J Electron Microsc (Tokyo). 1998;47(5):451-460.
- 277. Schilling WP, Ritchie AK, Navarro LT, Eskin SG. Bradykinin-stimulated calcium influx in cultured bovine aortic endothelial cells. Am J Physiol. 1988;255(2 Pt 2):H219-H227.
- 278. Muallem S, Schoeffield M, Pandol S, Sachs G. Inositol trisphosphate modification of ion transport in rough endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82(13):4433-44317.
- 279. Csutora P, Su Z, Kim HY Bugrim A, Cunningham KW, Nuccitelli R, Keizer JE, Hanley MR, Blalock JE, Marchase RB. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(1):121-126.
- 280. Schilling WP, Rajan L, Strobl-Jager E. Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics. J Biol Chem. 1989;264(22): 12838-12848.
- 281. Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. In: Born GVR, Schwartz CJ (eds.). Vascular Endothelium. Physiology, pathology, and therapeutic opportunities. Schattauer Stuttgart-New York, 1997;1-25.
- 282. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991; 43(2): 109-142.
- 283. Halimi J-M, Giraudeu B, Vol S, Caces E, Nivet H, Lebranchu Y, Tichet J. Effects of current smoking and smoking discontinuation on renal function and proteinuria in the general population. Kidney Int. 2000;58(3):1285-92.
- 284. Pinto-Sietsma SJ, Mulder J, Janssen WM, Hillege HL, De Zeeuw D, De Jong PE. Smoking is related to albuminuria and abnormal renal function in nondiabetic patients Ann Intern Med. 2000;133(8): 585-91.
- 285. Janssen WM, Hillege H, Pinto-Sietsma SJ, Bak AA, De Zeeuw D, de Jong PE; PREVEND Study Group. Prevention of Renal and Vascular End-stage Disease. Low levels of urinary albumin excretion are associated with cardiovascular risk factors in the general population. Clin Chem Lab Med. 2000;38(11):1107–10.
- 286. Omvik P. How smoking affects blood pressure. Blood Press. 1996;5(2): 71-7.
- 287. Orth SR. Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamics: influence on renal function. J Am Soc Nephrol. 2004;15(Suppl 1):S58-63.
- 288. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, Ferrario F, Fogo AB, Haas M, Heer E, Joh K, Noël LH, Radhakrishnan J, Seshan SV, Bajema IM, Bruijn JA (Renal Pathology Society) Pathologic classification of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2010;21(4):556-563.
- 289. Kuppachi S, Idris N, Chander PN, Yoo J. Idiopathic nodular glomerulosclerosis in a non-diabetic hypertensive smoker case report and review of literature. Nephrol Dial Transplant. 2006;21(12):3571-3575.
- 290. Liang K-V, Greene E-L, Oei L-S, Lewin M, Lager D, Sethi S. Nodular glomerulosclerosis: renal lesions in chronic smokers mimic chronic thrombotic microangiopathy and hypertensive lesions. Am J Kid Dis. 2007;49(4):552-559.
- 291. Costa AF, Gomes dos Santos WA, Filho MA, Farias FT, Modesto dos Santos V. Nodular glomerulosclerosis in a non-diabetic hypertensive smoker with dyslipidaemia. An Sist Sanit Navar. 2011; 34(2): 301-8.
- 292. Markowitz G-S, Lin J, Valeri A-M, Avila C, Nasr SH, D'Agati VD. Idiopathic nodular glomerulosclerosis is a distinct clinicopathologic entity linked to hypertension and smoking. Human Pathology. 2002;33(8):826-835.
- 293. Szilágyi T. Tobacco use in Hungary a situation analysis. In: Szilágyi T. (ed). Tobacco Control in Hungary. Past, Present, Future. Health 21 Hungarian Foundation; 2004. p. 10-19.; http://www.policy.hu/tszilagyi/content.html.
- 294. Toto DR. Renal biopsy: The nephrologist's viewpoint. In: Zhou XJ, Laszik Z, Nadasdy T, D'Agati VD, Silva FG. (eds). Silva's Diagnostic Renal Pathology. New York: Cambridge University Press; 2009. p. 47-54.
- 295. Kimmelstiel P, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. Am J Pathology. 1936;12(1): 83-98.
- 296. Schwartz MM, Lewis EJ, Leonard-Martin T, Lewis JB, Batlle D. Renal pathology patterns in type II diabetes mellitus: relationship with retinopathy. The Collaborative Study Group. Nephrol Dial Transplant. 1998;13(10):2547-52.
- 297. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fushegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. Metabolism. 1998;47(11):1348-1353.
- 298. Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, DeOreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM. Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. Kidney Int. 2000;57(6):2571-2585.

- 299. Daimon M, Ono Y, Saito T, Yamaguchi H, Hirata A, Ohnuma H, Igarashi M, Eguchi H, Manaka H, Kato T. Increased serum levels of pentosidine, but not carboxymethyl lysine, in type 2 diabetes without obvious diabetic nephropathy. Diabetes Care. 1999;22(5):877-878.
- 300. Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, Tanaka H, Maeda K, Kawashima S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: An advanced glycation end product. J Am Soc Nephrol. 1998;9(9):1681-1688.
- 301. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N^c-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. J Clin Invest. 1997;99(3):457-468.
- 302. Dolhofer-Bliesener R, Lechner B, Deppisch R, Ritz E, Gerbitz KD. Immunological determination of advanced glycosylation end-products in human blood and urine. Nephrol Dial Transplant. 1995;10(5):657-664.
- 303. Turk Z, Mesic R, Benko B. Comparison of advanced glycation endproducts on hemoglobin (Hb-AGE) and hemoglobin A_{1c} for the assessment of diabetic control. Clin Chim Acta. 1998;277(2):159-170.
- 304. Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K, Tsukada Y. Increased serum levels of advanced glycation endproducts and diabetic complications. Diabetes Res Clin Pract. 1998;41(2):131-137.
- 305. Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T, Jungers P, Drueke TB, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. Nephrol Dial Transplant. 1999;14(Suppl 1):76-78.
- 306. Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, Tanaka H, Maeda K, Kawashima S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: An advanced glycation end product. J Am Soc Nephrol. 1998;9(9):1681-1688.
- 307. Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, DeOreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM: Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. Kidney Int 2000, 57, 2571-2585.
- 308. Gerdemann A, Lemke HD, Nothdurft, Heidland A, Münch G, Bahner U, Schinzel R. Low-molecular but not highmolecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. Clin Nephrol. 2000;54(4):276-283.
- 309. Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. Diabetes 1991;40(2):190-196.
- Nagy J, Wittmann I. Nephropathia nem inzulindependens (2. típusú) diabetes mellitusban. Orvosi Hetilap 2000;141(12):609-614.
- 311. Snieder H, Sawtell PA, Ross L, Walker J, Spector TD, Leslie RD. HbA_{1c} levels are genetically determined even in type 1 diabetes: evidence from healthy and diabetic twins. Diabetes. 2001;50(12):2858-2863.
- 312. Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Allen TJ, Cooper ME, Skinner SL. A new model of diabetic nephropathy with progressive renal impairment in the transgenic (mRen-2)27 rat (TGR). Kidney Int. 1998;54(2):343-352.
- 313. Lane PH, Steffes MW, Fioretto P, Mauer SM. Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabétesz mellitus. Kidney Int. 1993;43(3):661-667.
- 314. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. Kidney Int Suppl. 2000;77:S93-98.
- 315. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med. 2001;79(2-3):76-102.
- 316. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz J. Renal injury from angiotensin IImediated hypertension. Hypertension. 1992;19(5):464-474.
- 317. Fogo AB. The role of angiotensin II and plasminogen activator inhibitor-1 in progressive glomerulosclerosis. Am J Kidney Dis. 2000;35(2):179-188.
- 318. Egido J: Vasoactive hormones and renal sclerosis. Kidney Int. 1996;49(2):578-597.
- 319. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension. 2001;38(3 Pt 2):635-638.
- 320. Moriya H, Ishida A, Nakabayashi I, Nishiyama JI, Kobayashi S. Juxtaglomerular cell tumor with retroperitoneal fibrosis and secondary immune-complex glomerulonephritis: a possible contribution of the renin angiotensin system to renal fibrosis. Am J Kidney Dis. 1999;34(3):E10.
- 321. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. Kidney Int. 1997;52(6):1497-1510.
- 322. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2001;10(3):321-329.
- 323. Trachtman H, Chan JCM, Chan W, Walderrama E, Brandt R, Wakely P, Futterweit S, Maesaka J, Ma C. Vitamin E ameliorates renal injury in an experimental model of immunglobulin A nephropathy. Pediatr Res. 1996;40(4):620-626.
- 324. Kuemmerle NB, Krieg RJ, Chan W, Trachtman H, Norkus EP, Chan JC. Influence of α-tocopherol over the time course of experimental IgA nephropathy. Pediatr Nephrol. 1999;13(2):108-112.
- 325. Chan JC, Mahan JD, Trachtman H, Scheinman J, Flynn JT, Alon US, Lande MB, Weiss RA, Norkus RP. Vitamin E therapy in IgA nephropathy: a double-blind, placebo-controlled study. Pediatr Nephrol. 2003;18(10):1015-1019.
- 326. Ghiggeri GM, Candiano G, Delfino G, Bianchini F, Queirolo C. Glycosyl albumin and diabetic microalbuminuria: demonstration of an altered renal handling. Kidney Int. 1984;25(3):565-570.
- 327. Daniels BS, Hauser EB. Glycation of albumin, not glomerular basement membrane, alters permeability in an in vitro model. Diabetes.1992;41(11):1415-1421.
- 328. Williams SK, Siegal RK. Preferential transport of non-enzymatically glucosylated ferritin across the kidney glomerulus. Kidney Int. 1985;28(2):146-152.

- 329. Cavallo-Perin P, Chiambretti A, Calefato V, Tomalino M, Cecchini G, Gruden G, Pagano G. Urinary excretion of glycated albumin in insulin-dependent diabetic patients with micro- and macroalbuminuria. Clin Nephrol. 1992;38(1):9-13.
- 330. Brinkman JW, de Zeeuw D, Lambers Heerspink HJ. Apparent loss of urinary albumin during long-term frozen storage: HPLC vs immunonephelometry. Clin Chem. 2007;53(8):1520-1526.
- 331. Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL. Coelution of other proteins with albumin during sizeexclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. Clin Chem. 2006;52(3):389-397.
- 332. Clavant SP, Sastra SA, Osicka TM, Comper WD. The analysis and characterization of immuno-unreactive urinary albumin in healthy volunteers. Clin Biochem 2006;39(2):143-151.
- 333. Magliano DJ, Polkinghorne KR, Barr EL, Su Q, Chadban SJ, Zimmet PZ, Shaw JE, Atkins RC. HPLC-detected albuminuria predicts mortality. J Am Soc Nephrol. 2007;18(12):3171-3176.
- 334. Brahma A, Mandal C, Bhattacharyya D. Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition. Biochim Biophys Acta. 2005;1751(2):159-169.
- 335. Fogazzi GB, Edefonti A, Garigali G, Giani M, Zolin A, Raimondi S, Mihatsch MJ, Messa P: Urine erythrocyte morphology in patients with microscopic haematuria caused by a glomerulopathy. Pediatr Nephrol 2008;23(7):1093-100.
- 336. Tesser Poloni JA, Bosan IB, Garigali G, Fogazzi GB. Urinary red blood cells: not only glomerular or nonglomerular. Nephron Clin Pract. 2012;120(1):c36-41; discussion c41.
- 337. Rath B, Turner C, Hartley B, Chantler C. What makes red cells dysmorphic in glomerular haematuria? Pediatr Nephrol. 1992;6(5):424-427.
- 338. Schuetz E, Schaefer RM, Heidbreder E, Heidland A. Effect of diuresis on urinary erythrocyte morphology in glomerulonephritis. Klin Wochenschr. 1985;63(13):575-577.
- 339. Hahm K, Lukashev ME, Luo Y, Yang WJ, Dolinski BM, Weinreb PH, Simon KJ, Chun Wang L, Leone DR, Lobb RR, McCrann DJ, Allaire NE, Horan GS, Fogo A, Kalluri R, Shield CF 3rd, Sheppard D, Gardner HA, Violette SM. Alphav beta6 integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. Am J Pathol. 2007;170(1):110-125.
- 340. Lebleu VS, Sugimoto H, Miller CA, Gattone VH 2nd, Kalluri R. Lymphocytes are dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix defect-induced Alport renal disease. Lab Invest. 2008;88(3):284-292.
- 341. Massy ZA. Importance of homocysteine, lipoprotein(a) and non-classical cardiovascular risk factors (fibrinogen and advanced glycation end-products) for atherogenesis in uremic patients. Nephrol Dial Transplant. 2000;15(suppl5):81-91.
- 342. Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. Atherosclerosis. 1999;142(1):67-77.
- 343. Locatelli F, Canaud B, Eckardt K, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C. Oxidatvie stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(7):1272-1280.
- 344. Busch M, Franke S, Müller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, Niwa T, Stein G. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. Kidney Int. 2004;66(1):338-347.
- 345. Suliman ME, Heimbürger O, Bárány P, Anderstam B, Pecoits-Filho R, Rodríguez Ayala E, Qureshi AR, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P. Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in endstage renal disease patients starting on dialysis therapy. J Am Soc Nephrol. 2003;14(6):1614-1622.
- 346. Pupim LB, Cagler K, Hakim RM, Shyr Y, Ikizler TA. Uremic malnutrition is a predictor of death independent of inflammatory status. Kidney Int. 2004;66(5):2054-2060.
- 347. Schwedler SB, Mezger T, Schinzel R, Wanner C. Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. Kidney Int. 2002;6(1):301-310.
- 348. Schinzel R, Münch G, Heidland A, Sebekova K. Advanced glycation end products in end-stage renal disease and their removal. Nephron. 2001;87(4):295-303.
- 349. Degenhardt T, Grass L, Reddy S, Thorpe S, Diamandis E, Baynes JW: Technical note. The serum concentration of N-(carboxymethyl)lysine is increased in uremia. Kidney Int. 1997;52(4):1064-1067.
- 350. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. Kidney Int. 1999;55(2):648-658.
- 351. World Health Organization Regional Office for Europe: The health situation in the European region, in Nosikov A, Jardel JP (eds): The European Health Report 2002. Copenhagen, WHO, 2002, pp 7-64.
- 352. Koliwad SK, Kunze DL, Elliott SJ. Oxidant stress depolarizes calf pulmonary arterial endothelial cells by increasing cation permeability. FASEB J.1994;3:A71.
- 353. Dimmeler S, Zeiher AM. Exercise and cardiovascular health: Get active to "AKTivate" your endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2003;107(25):3118-3120.
- 354. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 1999;399(6736):597-601.
- 355. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. Current Biol. 1999; 9(15):845-848.

- 356. Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability. Role of Arginine metabolism and oxidative stress. Hypertension. 2006;48(2):278-285.
- 357. Rodríguez-Crespo I, Gerber NC, Ortiz de Montenello PR. Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in Escheria coli, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. J Biol Chem. 1996;271(19):11462-11467.
- 358. Ravi K, Brennan LA, Snezena L, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(8):2619-2624.
- 359. Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid. Role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(12):2688-2695.
- 360. Michaud SÉ, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A. Cigarette smoke impairs VEGF-induced endothelial cell migration: Role of NO and reactive oxygen species. J Mol Cell Cardiol. 2006;41(2);275-84.
- 361. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell cell proliferation, survival and insulin responses? J Cell Sci. 2001;114(Pt 16):2903-2910.
- 362. Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. Biochem J. 1998;332(Pt 2):281-292.
- 363. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo. A specific vascular action of insulin. Circulation. 2000;101(6):676-681.
- 364. Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha SW, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JRC, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, King G. Activation of vascular protein kinase C- β inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. Diabetes. 2006;55(3):691-698.
- 365. Hirata K, Kuroda R, Sakoda T, Katayama M, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Yokoyama M. Inhibition of endothelial nitric-oxide synthase activity by protein kinase C. Hypertension. 1995;25(2):180-185.
- 366. Randhawa K, Mendes E, Wanner A. Acute effect of cigarette smoke and nicotine on airway blood flow and airflow in healthy smokers. Lung. 2006;184(6):363–8.
- 367. Rapaccini GL, Pompili M, Marzano MA, Grattagliano A, Cedrone A, Aliotta A, Pignataro F, Caturelli E, Cellerino C, Gasbarrini G. Doppler ultrasound evaluation of acute effects of cigarette smoking on portal blood flow in man. J Gastroenterol Hepatol 1996;11(11):997-1000.
- 368. Ritz E, Benck U, Franek E, Keller C, Seyfarth M, Clorius J. Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease. J Am Soc Nephrol. 1998;9(10):1798-804.
- 369. Jaimes EA, Tian RX, Raij L. Nicotine: the link between cigarette smoking and the progression of renal injury? Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;292(1):H76-82.
- 370. Aronow WS, Dendinger J, Rokaw S. Heart rate and carbon monoxide level after smoking high-, low-, and nonnicotine cigarettes. Ann Intern Med. 1971;74(5):697-702.
- 371. Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. Br J Pharmacol. 1997;121(5): 927–34.
- 372. Kaide JI, Zhang F, Wei Y, Jiang H, Yu C, WangW, Balazy M, Abraham NG, Nasjletti A. Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. J Clin Invest. 2001;107(9):1163–71.
- 373. Orosz Z, Csiszar A, Labinskyy N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;292(1):130–9.
- 374. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect 1985;64:111–26.
- 375. Rubanyi GM. (ed.). Cardiovascular significance of endothelum-derived vasoactive factors. Futura Publishing Company, Inc.: New York, 1991.
- 376. Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Yasue H. Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. Am J Physiol. 1994;266(3 Pt 2):H874–80.
- 377. Csekő Cs, Bagi Zs, Koller A. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. J Appl Physiol. 2004;97(3):1130–7.
- 378. Iesaki T, Wolin MS. Thiol Oxidation Activates a Novel Redox-Regulated Coronary Vasodilator Mechanism Involving Inhibition of Ca2+Influx. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(11):2359–65.
- 379. Prior HM, Yates MS, Beech DJ. Functions of large conductance Ca2+-activated (BKCa), delayed rectifier (KV) and background K+ channels in the control of membrane potential in rabbit renal arcuate artery. J Physiol. 1998;511 (Pt 1):159–69.
- 380. Dong H, Jiang Y, Triggle CR, Li X, Lytton J. Novel role for K+-dependent Na+/Ca2+exchangers (NCKX) in the regulation of cytoplasmic free Ca2+and contractility in arterial smooth muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(3):1226–35.
- 381. Iwamoto T, Kita S. Hypertension, Na+/Ca2+exchanger, and Na+/K+ -ATPase. Kidney Int 2006;69(12):2148–54.
- 382. Kuster GM, Lancel S, Zhang J, Communal C, Trucillo MP, Lim CC, Pfister O, Weinberg EO, Cohen RA, Liao R, Siwik DA, Colucci WS. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na(+)-Ca(2+) exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca(2+) depletion in cardiac myocytes. Free Radic Biol Med. 2010;48(9):1182–7.
- Brennan M-L, Hazen SL. Amino acid and protein oxidation in cardiovascular disease. Amino Acids. 2003;25(3-4): 365-374.

384. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Rad Biol Med. 1999;27(11-12):1151-1163.

385. Stadtman ER, Berlett BS: Fenton Chemistry – Amino acid oxidation. J Biol Chem. 1991;266(26):17201-17211.

- 386. Baynes JW. Perspectives in diabetes: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. 1991;40(4):405-412.
- 387. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids. 2003;25(3-4):207-218.
- 388. Fu S, Dean R, Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. J Biol Chem. 1998;273(44):28603-28609.
- 389. Sun J-Z, Kaur H, Halliwell B, Li XY, Bolli R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischaemia in vivo. Direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. Circulation Research. 1993;73(3):534-549.
- 390. Lubec B, Hayn M, Denk W, Bauer G. Brain lipid peroxidation and hydroxyl radical attack following the intravenous infusion of hydrogen peroxide in an infant. Free Rad Biol Med. 1996;21(2):219-223.
- 391. Dandona P, Mohanty P, Hamouda W, Ghanim H, Aljada A, Garg R, Kumar V. Inhibitory effect of two day fast on reactive oxygen species (ROS) generation by leukocytes and plasma ortho-tyrosine, meta-tyrosine concentrations. J Clinical Endocrinol Metabol. 2001;86(6):2899-2902.
- 392. Jörres R.A, Holz O, Zachgo W, Timm P, Koschyk S, Müller B, Grimminger F, Seeger W, Kelly FJ, Dunster C, Frischer T, Lubec G, Waschewski M, Niendorf A, Magnussen H. The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(6):1855-1861.
- 393. Ishimitsu S, Fujimoto S, Ohara A. Determination of m-tyrosine and o-tyrosine in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J Chromatogr. 1986;378(1):222-5.
- 394. Bergeron M, Scriver CR: Pathophysiology of renal hyperaminoacidurias and glucosuria. in: The kidney. Physiology and pathophysiology, edited by Seldin DW, Giebisch G, New York, Raven Press, 1985, pp 1725-1745.
- 395. Ishimitsu S, Fujimoto S, Ohara A. Determination of m-tyrosine and o-tyrosine in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J Chromatogr. 1986;378(1):222-225.
- 396. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ, Framingham Study. Obesity and systemic oxidative stress. Clinical correlates in the Framingham Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(3):434-439.
- 397. Adler's physiology of the eye., Ed.: Williams M. Hart, 9th edition, Mosby Year Book Inc. 1992 pp. 348-90.
- 398. Bron AJ, Vrensen GF, Koretz J, Maraini G, Harding JJ. The ageing lens. Opthalmologica. 2000;214(1):86-104.
- 399. Kessel L, Hougaard JL, Sander B, Kyvik KO, Sorensen TI, Larsen M. Lens ageing as an indicator of tissue damage associated with smoking and non-enzymatic glycation a twin study. Diabetologia. 2002,45(10):1457-62.
- 400. Chylack LT Jr. Mechanisms of senile cataract formation. Ophthalmology. 1984:91(6):596-602.
- 401. Bron AJ, Sparrow J, Brown NA, Harding JJ, Blakytny R. The lens in diabetes. Eye (Lond) 1993;7(Pt 2):260-75.
- 402. Van Boekel MA, Hoenders HJ. Glycation of crystallins in lenses from ageing and diabetic individuals. FEBS Lett. 1992;314(1):1-4.
- 403. Balog Z, Klepac R, Sikic J, Jukic-Lesina T. Protein carbonylation and glycation in human lenses. Coll Antropol. 2001;25 Suppl:145-148.
- 404. Guptasarma P, Balasubramanian D, Matsugo S, Saito I. Hydroxyl radical mediated damage to proteins, with special reference to the crystallins. Biochemistry. 1992;31(46):4296-4303.
- 405. Themann C, Teismann P, Kuschinsky K, Ferger B. Comparison of two independent aromatic hydroxylation assays in combination with intracerebral microdialysis to determine hydroxyl free radicals. J Neuroscience Methods. 2001;108(1):57-64.
- 406. Rodgers KJ, Dean RT Metabolism of protein-bound DOPA in mammals. Int J Biochem Cell Biol. 2000;32(9):945-55.
- 407. Wells-Knecht MC, Huggins TG, Dyer DG, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidized amino acids in lens proteins with age. Measurement of o-tyrosine and dityrosine in the ageing human lens. J Biol Chem. 1993;268(17):12348-12352.
- 408. Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. Endocrinol Metab Clin North Am. 2008;37(3):685-711.
- 409. Iozzo P. Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin resistance start? The adipose tissue. Diabetes Care. 2009;32 Suppl 2:S168-73.
- 410. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. Nature. 2006;440(7086):944-8.
- 411.Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. Am J Transl Res. 2010;2(3):316-31.
- 412.Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. Sci STKE 2005; 268: pe4.
- 413. Vinayagamoorthi R, Bobby Z, Sridhar MG. Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. J Endocrinol. 2008;197(2):287-96.
- 414. Eringa EC, Stehouwer CD, van Nieuw Amerongen GP, Ouwehand L, Westerhof N, Sipkema P. Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by ERK1/2 activation in endothelium. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287(5): H2043-8.

dc_360_¹⁵

- 415. Lee JH, Ragolia L. AKT phosphorylation is essential for insulin-induced relaxation of rat vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;291(6): C1355-65.
- 416. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. J Clin Invest. 1994;94(3): 1172-9.
- 417. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. Physiol Rev. 2009;89(1): 27-71.
- 418. May JM, de Haen C. Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. J Biol Chem. 1979;254(7): 2214-20.
- 419. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H2O2. Am J Physiol. 1999;277(3 Pt 2):H978-85.
- 420. Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(6): 1430-42.
- 421. Ardanaz N, Beierwaltes WH, Pagano PJ. Comparison of H2O2-induced vasoconstriction in the abdominal aorta and mesenteric artery of the mouse. Vascul Pharmacol. 2007;47(5-6):288-94.
- 422. Yang ZW, Zheng T, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. Eur J Pharmacol. 1998;344(2-3):169-81.
- 423. Mian KB, Martin W. Hydrogen peroxide-induced impairment of reactivity in rat isolated aorta: potentiation by 3amino-1,2,4-triazole. Br J Pharmacol. 1997;121(4):813-9.
- 424. Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. Circulation. 2005;112(16):2487-95.
- 425. Wang K, Spector A. ATP causes small heat shock proteins to release denaturated protein. Eur J Biochem. 2001;268(24):6335-6345.
- 426. Bours J, Fodisch HJ, Hockwin O. Age-related changes in water and crystallin content of the fetal and adult human lens, demonstrated by a microsectioning technique. Ophthalmic Res. 1987;19(4):235-239.
- 427. Brady JP, Garland D, Duglas-Tabor Y, Robinson WG Jr., Groome A, Wawrousek EF. A-crystallin gene induces cataract and Targeted disruption of the mouse cytoplasmatic inclusion bodies containing the small heat shock protein B-crystallin. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(3):884-889.
- 428. Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A: Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol 2004;86(3):407-485.
- 429. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Rad Biol Med. 1999;27(11-12):1151-1163.
- 430. Smeets MH, Vrensen GF, Otto K, Puppels GJ, Greve J. Local variations in protein structure in the human eye lens: a Raman microspectroscopic study. Biochim Biophys Acta. 1993;1164(3):236-42.
- 431. Siebinga I, Vrensen GF, Otto K, Puppels GJ, De Mul FF, Greve J. Ageing and changes in protein conformation in the human lens: a Raman microspectroscopic study. Exp Eye Res. 1992;54(5):759-67.
- 432. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids. 2003;25(3-4):207-218.
- 433. Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao ChM. Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity. J Biol Chem. 2003;278(51):51159-51166.
- 434. Brennan M-L, Hazen SL. Amino acid and protein oxidation in cardiovascular disease. Amino Acids. 2003;25(3-4):365-374.
- 435. Leeuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. Free Rad Biol Med. 1999;27(1-2):186-192.
- 436. Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgous monkey artery wall protein in early diabetic vascular disease. J Clin Invest. 2001;107(7):853-60.
- 437. Wang K, Spector A. ATP causes small heat shock proteins to release denaturated protein. Eur J Biochem. 2001; 268(24):6335-6345.
- 438. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Rad Biol Med. 1999;27(11-12):1151-1163.
- 439. Fu S, Dean R, Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in nuclear lens cataractogenesis. J Biol Chem 1998;273(44):28603-28609.
- 440. Siebinga I, Vrensen GF, Otto K, Puppels GJ, De Mul FF, Greve J: Ageing and changes in protein conformation in the human lens: a Raman microspectroscopic study. Exp Eye Res. 1992;54(5):759-67.
- 441. Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao ChM. Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity. J Biol Chem. 2003;278(51):51159-51166.
- 442. Santhoshkumar P, Sharma KK. Phe71 is essential for chaperone-like function in alpha A-crystallin. J Biol Chem. 2001;276(50):47094-47099.
- 443. Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(2):H854-60.
- 444. Ilkova H, Glaser B, Tunçkale A, Bagriaçik N, Cerasi E. Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients by transient intensive insulin treatment. Diabetes Care. 1997;20(9):1353-6.

- 445. Dupuy O, Mayaudon H, Palou M, Sarret D, Bordier L, Bauduceau B. Optimized transient insulin infusion in uncontrolled type 2 diabetes: evaluation of a pragmatic attitude. Diabetes Metab. 2000;26(5):371-5.
- 446. Park S, Choi SB. Induction of long-term normoglycemia without medication in Korean type 2 diabetes patients after continuous subcutaneous insulin infusion therapy. Diabetes Metab Res Rev. 2003;19(2):124-30.
- 447. Ryan EA, Imes S, Wallace C. Short-term intensive insulin therapy in newly diagnosed type 2 diabetes. Diabetes Care. 2004;27(5):1028-32.
- 448. Weng J, Li Y, Xu W, Shi L, Zhang Q, Zhu D, Hu Y, Zhou Z, Yan X, Tian H, Ran X, Luo Z, Xian J, Yan L, Li F, Zeng L, Chen Y, Yang L, Yan S, Liu J, Li M, Fu Z, Cheng H. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallelgroup trial. Lancet. 2008;371(9626):1753-60.
- 449. Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: effect of reinstitution of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. J Diabetes Complications. 2004;18(5):282-8.
- 450. Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. J Biol Chem. 2010;285(28):21581-9.
- 451. Wu X, Zhu L, Zilbering A, Mahadev K, Motoshima H, Yao J, Goldstein BJ. Hyperglycemia Potentiates H2O2 Production in Adipocytes and Enhances Insulin Signal Transduction: Potential Role for Oxidative Inhibition of Thiol-Sensitive Protein-Tyrosine Phosphatases. Antioxid Redox Signal. 2005;7(5-6):526–537.
- 452. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H2O2. Am J Physiol. 1999;277(3 Pt 2):H978-85.
- 453. Ceriello A, Pirisi M. Is oxidative stress the missing link between insulin resistance and atherosclerosis? Diabetologia. 1995;38(12):1484-1485 (Letter).
- 454. Jennings PE, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JJ. Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in Type II diabetic patients: clinical assessment. Metabolism. 1992;41(5 Suppl 1):36-39.
- 455. Ha H, Yoon SJ, Kim KH. High glucose can induce lipid peroxidation in the isolated rat glomeruli. Kidney Int. 1994;46(6):1620-1626.
- 456. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. Free Radic Biol Med. 1994;16(3);383-391.
- 457. Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Mularoni E, Hahn A, Anfossi G.Insulin increases cyclic nucleotide content in human vascular smooth muscle cells: a mechanism potentially involved in insulin induced modulation of vascular tone. Diabetologia. 1995;38(8):936-941.
- 458. Wolin MS, Belloni FL. Superoxide anion selectively attenuates cathecholamin-induced contractile tension in isolated rabbit aorta. Am J Physiol. 1985;249(6Pt 2):H1127-1135.
- 459. Rubányi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions an hyperoxia inactuvate endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol. 1986;250(5Pt 2):H822-827.
- 460. Wolin MS, Cherry PD, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G. Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to acethylcholine and nitric oxide via the extracellular generation of superoxide anion. J Pharmacol Exp Ther. 1990;254(3):872-876.
- 461. Marczin N, Ryan US, Catravas JD. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and EDRF-induced cGMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. J Pharmacol Exp Ther. 1992;263(1):170-179.
- 462. Ferrannini E, DeFronzo RA. Insulin actions in vivo: glucose metabolism. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P (eds) International textbook of diabetes mellitus. Wiley, Chichester NewYork Brisbane Toronto Singapore, 1992; pp 409-438.
- 463. Guignot L, Mithieux G. Hyperglycemia, but not hyperinsulinemia, inhibits liver glucose-6-phosphatase activity in rat. Diabetologia. 1996;39:13. (Abstract).
- 464. Robbins BL, Foster JD, Nordlie RC. Metabolic intermediates as potential regulators of glucose-6-phosphatase. Life Sci. 1991;48(11):1075-1081.
- 465. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. Diabetes. 1993;42(6):801-813.
- 466. Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem J. 1967;103(2):514-526.
- 467. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the etiology of diabetes mellitus and complications. Br Med Bull. 1993;49(3):642-652.
- 468. LeBel D, Poirier GG, Beaudoin AR. A convenient method for the ATPase assay. Anal Biochem. 1978;85(1):86-89.
- 469. Goldfinger TM. Beyond the French paradox: the impact of moderate beverage alcohol and wine consumption in the prevention of cardiovascular disease. Cardiol Clin. 2003;21(3):449-57.
- 470. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet. 1992;339(8808):1523-1536.
- 471. Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic science to the clinic. Cell Cycle. 2007;6(20):2495-510.
- 472. Silan C. The Effects of Chronic Resveratrol Treatment on Vascular Responsiveness of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Biol Pharm Bull. 2008;31(5):897-902.
- 473. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin Present in Red Wine, Enhances Expression and Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase. Circulation. 2002;106(13):1652-1658.

- 474. Rüweler M, Gülden M, Maser E, Murias M, Seibert H. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astroglioma cells in vitro. Chem Biol Interact. 2009;182(2-3):128-35.
- 475. Bhavnani BR, Cecutti A, Gerulath A, Woolever AC, Berco M. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. Menopause. 2001;8(6):408-419.
- 476. Nagaretani H, Nakamura T, Funahashi T, Kotani K, Miyanaga M, Tokunaga K, Takahashi M, Nishizawa H, Kishida K, Kuriyama H, Hotta K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Visceral fat is a major contributor for multiple risk factor clustering in Japanese men with impaired glucose tolerance. Diabetes Care. 2001;24(12):2127–2133.
- 477. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28(7):412–419.
- 478. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Järvinen H, Van Haeften T, Renn W, Gerich J. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. Diabetes Care. 2000;23(3):295–301.
- 479. Wenceslau CF, Davel AP, Xavier FE, Rossoni LV. Long-term ouabain treatmentimpairs vascular function in resistance arteries. J Vasc Res. 2011;48(4):316-26.
- 480. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. Pharmacol. Rev. 2009;61(1):9-38.
- 481. Laredo J, Shah JR, Lu ZR, Hamilton BP, Hamlyn JM. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. Hypertension. 1997;29(1 Pt 2):401-7.
- 482. Shah JR, Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM. Effects of angiotensin II on sodium potassium pumps, endogenous ouabain, and aldosterone in bovine zona glomerulosa cells. Hypertension. 1999;33(1 Pt 2):373-7.
- 483. Bauer N, Müller-Ehmsen J, Krämer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RH, Neu H, Kirch U, Grünbaum EG, Schoner W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: Effects of βblockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. Hypertension. 2005;45(5):1024-8.
- 484. Manunta P, Stella P, Rivera R, Ciurlino D, Cusi D, Ferrandi M, Hamlyn JM, Bianchi G. Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor in essential hypertension. Hypertension. 1999;34(3):450-6.
- 485. Balzan S, Neglia D, Ghione S, D'Urso G, Baldacchino MC, Montali U, L'Abbate A. Increased circulating levels of ouabain-like factor in patient with asymptomatic left ventricular dysfunction. Eur J Heart Fail. 2001;3(2):165-71.
- 486. Manunta P, Iacoviello M, Forleo C, Messaggio E, Hamlyn JM, Lucarelli K, Guida P, Romito R, De Tommasi E, Bianchi G, Rizzon P, Pitzalis MV. High circulating levels of endogenous ouabain in the offspring of hypertensive and normotensive individuals. J Hypertens. 2005;23(9):1677-81.
- 487. Rüweler M, Gülden M, Maser E, Murias M, Seibert H. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astroglioma cells in vitro. Chem Biol Interact. 2009;182(2-3):128-35.
- 488. Silan C. The Effects of Chronic Resveratrol Treatment on Vascular Responsiveness of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Biol Pharm Bull. 2008;31(5):897-902.
- 489. Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. Biochem Pharmacol. 2009;77(6):1053-63.
- 490. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, Bagchi D, Das DK, Maulik N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. Free Radic Biol Med. 2007;43(5):720-9.
- 491. Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP. Oxidative stress and vascular disease in diabetes: is the dichotomization of insulin signaling still valid? Free Radic Biol Med. 2008;44(6):1209-15.