

AZ L-ARGININ - NITROGÉN MONOXID RENDSZER

SZEREPE A

VESEBETEGSÉGEK PROGRESSZÍÓJÁBAN

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Wagner László

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

Program- és témavezető: Prof. Dr. Nagy Judit

Pécs, 2002

1. BEVEZETÉS

A vesebetegségek egy része krónikussá válhat, a krónikus vesebetegségek (KVB) egy hányada végstádiumú veseelégtelenséghez (VVE) vezethet. Bizonyos vesebetegségekben a progresszió gyakori, míg más esetekben ritka és általában lassú a betegség előrehaladásának folyamata. Ugyanazon vesebetegség azonban nem mindig romlik, és a vesebetegség típusa sem kizárólagosan határozza meg a progressziót: a vesefunkció romlásának üteme egyénenként is változik, melyet valószínűleg több faktor befolyásol. Az ismert faktorok közül többnek patomechanizmusában (pl. hemodinamikai tényezők, magas vérnyomás, stb.) szerepet játszik az L-arginin (L-arg) – nitrogén monoxid (NO) – ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) rendszer zavart működése.

A vesebetegségek nagy része ma még alig vagy egyáltalán nem gyógyítható, azonban progressziójuk jelentősen befolyásolható, aminek kapcsán akár étvelkel-évrizdedekkel toható ki a szükségesé váló művesekezelés vagy vese-transzplantáció, illetve lassítható az egész szervezetet érintő tulajdonképpen öregezési és elhasználódási folyamat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt az L-Arg - NO rendszer befolyásolhatóságának vizsgálata in vitro és in vivo, egészséges és kóros - vesebetegségre jellemző, illetve annak progresszióját befolyásoló - körülmények között, illetve ezek modelleiben; végül e folyamatok klinikai jelentőségének megítélése. Így:

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

3. MÓDSZEREK

Sejtek izolálása: Patkány mezentériumból származó arterioláris (RMAEC) és venuláris (RMVEC) endotélisejteket, továbbá disznó aorta endotélisejteket (PAEC) izoláltunk. Sejttenyésztés: Az izolálás során nyert endotélisejteket és más endotélisejt fajtaikat (HDMVEC - humán dermális mikrovaszkuláris endotélisejtek, HGEC - humán glomeruláris endotélisejtek, BTAEBC - marha thoracalis aorta endotélisejtek) tenyésztettük. Sejtszámolás: A sejteket (mobilizálásuk után) Coulter Counter segítségével számoltuk. Trombocitaszuszpenziót humán vérlemezékéből készítettünk, izolálás után, detergens segítségével. A sejtlizátumok és szövethomogenizátumok összfehérje tartalmának meghatározása a sejtlizátumokból Lowry módszerrel adaptációja alapján történt. A vizetlet összfehérje tartalmának mérését Bradford módszer szerint végeztük. Az NO szintetáz (NOS) aktivítást élő sejtekben illetve homogenizált szövetekben az [3 H]-L-arg - [3 H]-L-cit konverzió mérése alapján határoztuk meg. L-arg transzport mérése: Az endotélisejtek [3 H]-L-arg felvételének sebességét mértük. Western blot: Az endotélisejteket vagy patkány szöveteket lizáltunk, fehérjeit homogen SDS-poliakrilamid minigelen elektroforezizáltuk, nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A fehérjék gélre történt egyenlő mértéki felvitelét és transzferét Ponceanu vörös festéssel és a β -aktin mennyiségének méréseivel vizsgáltuk. Az eNOS-t, iNOS-t, nNOS-t és a β -aktin kemilumineszcenciás módszerrel mutattuk ki, a kapott csíkokat denzitometráltuk. Az L-arg, aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA), szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) és N^G -monometil-L-arginin (L-NMA) koncentráció mérése a sejtlizátumokból illetve humán plazmából reverz fázisú HPLC-vel történt (prekolumnáris derivatizációval, fluorezcens detekcióval, AccQ-Tag módszerrel). Dohányfüst puffert (SB) készítése: Cigaretta füstjét Krebs-oldaton buborékolattuk át, amit különböző arányban hígítottunk. A dohányfüst formaldehid tartalmát Nash reagens segítségével, fotometriásan határoztuk meg. A formaldehid SH-csoport főgyasztását Ellman reagens alkalmazásával mértük. A glükóz és az L-arg egymáshatásából termelődött szabad gyökök kimutathatóság elektron spin rezonancia (ESR) és spin trap ESR módszereket használtunk. A mikrocirkulációból származó erek sebességi eltávolítása: Patkányokban a vékonybél egy szegmensét és a hozzá tartozó mezentériumot eltávolítottuk, majd mikroszkóp alatt, ugyanolyan rendű pre- és posztkapilláris árgákat izoláltunk. Patkányokat krónikus hólyag- és vaszkuláris kanulókkel láttunk el. A yeseftükción mérések a következők voltak: glomeruláris filtrációs ráta és renális plazmaáramlás, inulin és para-aminohippursav klirensz, átlag vérnyomás mérése, illetve a nátrium kiválasztás mérése. A filtrációs frakciót és a renális vaszkuláris rezisztanciát számoltuk. A plazma urea szintet kit-tel mértük. A nitrit és nitrát (NO₂) mérése a 24 órás vizelethől a Griss-módszer alkalmazásával történt. Endothelin-1 (ET) és GMRF-1 vizelethől radioimmunoassay-vel határoztuk meg. Embereken a 24 órás vérnyomás monitorozást oszillometriás elven működő

vényomásmonitorokkal végeztük; a monitor programozása és a mérési adatok leolvasása számítógéppel történt.

ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK (a tézisek római számokkal jelezve)

Endotélisejtek intakt L-arg - NO rendszerre in vitro

Az érendszer endotél funkciójában szignifikáns különbségek fedezhetők fel. Különbség van a konduktív erek és a rezisztenciaerek között, de a rezisztenciaerek különböző szintjei között is, ugyanabban az érendszerben, akár ugyanazon az éren belül is (mint szegmentális különbségek) az NO termelő képességben. A fenotípusosan megjelenő különbségek gyakran megmaradnak sejtenyészeten is. Továbbá bizonyítékok vannak az artériák és vénák endotélisejtjeinek heterogenitására is. Kísérleteinkben vizsgáltuk és összehasonlítottuk a mikrocirkulációból származó párosított arterioláris és venuláris endotélisejtek alap (öröklött) NO termelő képességét.

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

A posztkapillárisan folyamatosan termelődő NO hozzájárul az alacsony venuláris vaszkuláris rezisztenciához (ami szükséges a kapillárisok megvédéséhez a nagy hidrosztatikai nyomástól), illetve szerepet játszik a venulafal átteresztőképességének szabályozásában is. Továbbá, a venuláris NO képes átitfundálni a közeli arteriolákhoz is. Valószínű azonban, hogy elsődleges szerepe a fehérvérsejtek aggregációjának és adhéziójának gátlása. Az alacsony nyiroérőti környezetben lehetővé teszi a fehérvérsejtek kiapadkását, amit az NO megakadályoz, a következőképpen kialakuló gyulladássos válaszal együtt. A NOS gátlása nem befolyásolja a kísérletesen okozott trombozist arteriolákban, de jelentősen fokozza azt venulákban, és exogén L-arg, illetve NO-donorok megelőzik az akut NOS-gátlás protrombotikus hatásait venulákban. Az NO e szelektív hatása különösen jelentős, mivel a citokin-stimulált monocita adhézió elsődlegesen a venuláris endotéliumon jön létre. Így a venulák nagyobb bazális NO produkciója lehet kompenzatórikus adaptáció, mely alacsony nyiroérőti környezetben a tromboembóliák kialakulásának megelőzését szolgálja.

A dohányfüst hatása az NO-cGMP útonalra: cGMP és GSH meghatározás dohányfüst modeliben

Az NO-cGMP rendszer érzékeny az oxidatív stresszre. A dohányfüst toxikus összetevői közül sok a szabad gyökök tulajdonságú (pl. a nitrogén oxidált származékai), más komponensek, mint pl. a formaldehid, olyan elváltozásokat okoznak a sejtek antioxidáns védekező rendszerében, amelyek a sejteket a szabad gyökös behatásokra érzékenyvé teszik.

Sertés aorta endotélsejtek NO-termelését bradikinnel indukáljuk. A sejteket ezután dohányfüst pufferral különböző ideig és különböző koncentrációban kezeljük, antioxidánsok jelenlétében illetve hiányában. Az NO termelődés kimutatására a guanilát cikláz enzim aktiválódása során létrejövő cGMP felszabadulás mértékének meghatározását választottuk. Mértük a dohányfüst formaldehid-tartalmát és glutation-fogyasztását.

II. Vizsgálataink szerint a dohányfüst csökkenti az endotélsejtek nitrogén monoxid termelését, mely hatás glutationnal kivédhető.

III. A dohányfüst jelentős mennyiségű formaldehidet tartalmaz, amely nagy aktivitással csökkenti a redukált glutation mennyiségét.

Eredményeink arra utalnak, hogy a dohányfüst az endotélseji cGMP termelését a kritikus tiol csoportok oxidációja révén gátolja. A dohányfüst az NO - guanilát cikláz - cGMP jelátvitel több pontján képes hatni, mivel a működéshez szükséges tiol csoportok a rendszer több lépésében is megtalálhatók. Sőt már az NO termelődése előtti szakasz, az NO produktót indukáló, agonista-kiváltóra kalcium beáramlás károsodhat az endotélsejtekben az oxidatív stressz hatására.

A GSH nem specifikus scavangerként a legtöbb oxidáló ágenszt képes elfogni. Így például gátolja a dohányfüstben nagy koncentrációban jelenlevő nitrogén oxidok hatását is. Meglepő, hogy a dohányfüst nagy NO koncentrációja ellenére az endotélsejtekben nem cGMP növekedést, hanem csökkentést okozott. Ennek a magyarázata abban lelhető, hogy a dohányfüst-puffer preparálása során a dohányfüst vizes extraktuma kb. 10 percet állt mielőtt a sejtekkel kapcsolatba került. Ez idő alatt az NO átalakultait, hiszen féltételeje oxigén jelenlétében néhány másodperc. Ugyanez lehet a sorsa a dohányfüstnek és az NO-nak is a szervezetben. A dohányfüst inhalálása után a vér vörösvértestjei gyorsan NO₂-vé, majd NO₃-á alakítják az NO-t, miközben oxidatív stressz lép fel bennük. Így a tüdőben történő expozíció hatását a vörösvértestek transzportjára a tüdőtől távoli szervekbe is. Természetesen ezek a szabad gyökös folyamatok elsősorban a vörösvértestekkel közvetlen kapcsolatba kerülő endotélsejteket érintik. Az oxidatív stressz miatt a hem kiszabadulhat

a vörösvértestekből és a szabad gyökök direkt vagy indirekt módon (az LDL oxidálása következtében) károsíthatják az endotélsejteket.

A cigarettafüstben nagy mennyiségű formaldehidet tudunk kimutatni. A formaldehid alapvetően két mechanizmus segítségével képes károsítani a fehérjéket. Egyrészt keresztlinkteket létesít a fehérjék aminoszoptorjai között, másrészt a tiol csoporttal reagál. A GSH a formaldehiddel reagál, így a formaldehid elfogyasztja a szövetek egyik legfontosabb antioxidáns molekuláját. Ezáltal a sejtek SH-enzimeinek aktiválása megváltozik, például a NOS inaktiválódhat.

Valószínűnek tartjuk, hogy kísérleteinkben a GSH protektív hatása azáltal is kifejlődhetett, hogy gátolta a dohányfüst formaldehid tartalmának károsító effektusát.

A dohányzás hatása az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételére

A dohányfüst fehérje degenereációt (szabad gyök-kiváltotta degradáció, és keresztlinktések létrejötte, interbrídging, azaz nagymolekulásúvíú termékek képződése) okozó hatásának kimutatására (amely minden valószínűség szerint érinti az NO-cGMP rendszert is) natív poliakrilamid géll elektroforézist használtunk: SB-vel kezelt sertés aorta endotélsejtek és humán trombociták fehérjéit vizsgáltuk.

IV. Natív poliakrilamid géll elektroforézis vizsgálatokkal igazoltuk endotélsejtek és trombociták fehérjéinek dohányfüstre bekövetkező ástrukturálódását.

Az aktív eNOS izozim dimer alakban fordul elő (molekulásúlya kb. 270 kD). Az SDS-PAGE módszer során bekövetkező denaturáció miatt az nem alkalmas a dimer vizsgálatára. Mosott trombociták és endotélsejtek esetén dohányfüst hatására natív PAGE módszerrel fehérje elütését észleltük a 270 kD molekulásúvíú tartományban. A fehérje elütése a dohányfüst koncentrációjától, illetve az expozíció idejétől függött, mely kivédhető volt GSH kezeléssel, és némileg fokozható volt GSSG hozzáadásával. Feltehetően, hogy a megfigyelt fehérje-elütés kapcsolatba hozható az eNOS enzim gátlásával, amire előző kísérletünkben a cGMP termelés csökkentése utalt.

A trombociták szabad gyök termelése hiperinzulinémiában

Hyperinzulinémia alakulhat ki csökkent glükóz toleranciában, kettes típusú diabetes mellitusban, illetve inzulin adagolás kapcsán. Az inzulin NO termelést indukál trombocitákban. Továbbá, az inzulin gátolja a vértlemecke ATP kibocsátását. Az inzulin ezen hatását a NOS enzim szubsztrát L-arg felerősíti. Ezek alapján valószínűnek tartottuk, hogy az inzulin gátló hatásának intracelluláris hírvívője, a vértlemecke ATP-kibocsátás vonatkozásában, az NO. Kiváncsiak voltunk,

hogy különböző inzulin-szintek milyen hatással vannak az NO-termelésre. Mivel az NO szabad gyök, ezért kimutatására luminol mediálta kemilumineszcenciás módszert állítottunk be (az NO szuperoxid anion szabad gyökkel peroxinitrit képez, mely a luminollal reagálva kemilumineszcenciát hoz létre). Ezután L-N-NAME-mel illetve szuperoxid dizmutázzal kombináltuk az inzulint.

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

Az inzulin koncentráció-függően növelte a kemilumineszcenciát trombocitákban. Mind az L-N-AME, mind a szuperoxid dizmutáz koncentráció-függően gátolta az inzulin kemilumineszcenciát okozó hatását, bizonyítva a peroxinitrit keletkezését. A NOS enzim elektron transzportja bizonyos körülmények között "szétkapcsolódik", pl. alacsony arginin koncentrációnál a NOS növekvő mértékben termel szuperoxid anion szabad gyököt, ami NO-val kapcsolódva peroxinitrit képződéshez vezet. Kísérletünkben argináz adása, ami az arginin szintet csökkenti, önmagában peroxinitrit jelet adott.

Az L-arg nem enzimátikus glikációja

Jelen tudásunk szerint, a nem-enzimátikus glikáció az egyik legfontosabb patofiziológiai tényező a diabetes mellitus szövődményeinek kialakulásában. Felvetették ennek esetleges szabad gyökös jellegét. Amennyiben a nem-enzimátikus glikáció során szuperoxid anion szabad gyök is termelődik, akkor a folyamatnak szerepe lehet az NO inaktiválásában.

Vizsgálatainkban ESR és spin trap ESR módszereket alkalmaztunk a glükóz és az L-arg egymáshatolásából termelődött szabad gyökök kimutatására. Az L-arg a NOS enzim szubsztrátja, ezért fontos lehet az L-arg nem-enzimátikus glikációból eredő módosulása. A kémiai reakciók magasabb hőmérsékleten gyorsabban mennek végbe, ezért feltételezhető volt, hogy a termelődő szabad gyökök mennyisége is nagyobb ilyenkor.

VI. Vizsgálataink szerint ESR spektroszkópia alkalmazásával igazolható, hogy az L-arg és a glükóz reakcióba lép egymással.

VII. ESR vizsgálatokkal igazolunk az L-arg + glükóz reakció hőmérséklet függését is. E módszer érzéketlensége miatt az L-arg + glükóz reakció teszt hőmérsékleten nem detektálható.

VIII. Az L-arg + glükóz reakció a vas első sorban redukált, ferro állapotban (Fe^{2+}) katalizálja.

Minden bizonnyal *in vivo* is lejátszódik az általunk magas hőmérsékleten detektált L-arg glikáció, csak túl lassú a reakció sebessége ahhoz, hogy ezzel a módszerrel mérhető legyen.

Az L-arg glikációját a vas katalizálja, amely katalizist a ferri-ferro redukciót gátló dezferrioxamin megakadályozza, így feltételezhető, hogy a folyamat melléktermékeként szuperoxid anion szabad gyök is termelődik, hiszen a ferro vas képes az oxigént redukálni. Az így termelt szuperoxid anion szabad gyök hatásait vizsgálva az inzulin-NO szignált. Az előrehaladott glikációs végtermékek NO-hatást gátló effektusa jól ismert.

A disszertációban nem közölt adataink alapján, L-arg jelenlétében az oldatokban általában nyomokban jelenlevő vas elég ahhoz, hogy hidroxil szabad gyök keletkezzen már szobahőmérsékleten is: szuperoxid anion szabad gyök termelődése révén, ami spontán dizmutálódhat hidrogén peroxiddá, ami a Fenton reakcióban hidroxil szabad gyököt hoz létre. A hidroxil szabad gyök hatására viszont glükóz jelenlétében glükóz szabad gyök képződhet, amely reaktív tulajdonsága miatt fokozottan képes a glikációs folyamatok megindítására.

Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatása endotélsejtekre

A vaszkuláris endotélsejtek által folyamatosan termelt NO-nak fő feladata az erek tónusának befolyásolása, a vérnyomás és a véráramlás szabályozása. A NOS-gátló hatású arginin analógok plazmában történő felhalmozódása csökkent eNOS aktivitást eredményezhet. Az NO hiányának nagy valószínűséggel szerepe van a veseelégtelenség következtében másodlagosan kialakuló magas vérnyomásban.

Kiváncsiak voltunk, hogy a KVB-ben szenvedő betegek plazmájának is van-e eNOS-gátló hatása, ami hozzájárulhat a magas vérnyomáshoz. Humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejt (HDMVEC) tenyésztésben vizsgáltuk, hogy van-e a plazmában olyan anyag, ami befolyásolja az endotélium NO termelését.

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

A betegkezből származó plazmát öszörösítve hígítottuk, így az inkubáló oldat ADMA koncentrációja ~ 0,5 µM volt. Ez a koncentráció in vitro nem befolyásolja az eNOS aktivitást; in vivo azonban valószínű, hogy a megemelt plazma ADMA szint részt vesz az eNOS gátlásban, és markere is lehet más, az eNOS-t gátló anyagok felhalmozódásának.

Miért csak bizonyos betegekben magasabb a plazma ADMA szint? A metilarginin lebontható végző enzim aktivitásának gátlása növelheti az ADMA szintjét. Az endotélsejtekben megtalálható az S-adenozilmetionin-függő metiltranszferázok, melyek azokat a fehérféket metilálják, melyekből következményesen ADMA és SDMA keletkezik a lebonlás során. E metiltranszferázok szintje endotélsejtekben LDL-koleszterin hatására feltehetőleg, és így megemelt ADMA termeléshez vezet. Elképzelhető, hogy e két faktor szerepet játszhat a KVB progressziójában. Hogy miért emelkedett a plazma ADMA szint bizonyos betegekben, még nem világos jelenleg, de mindenesetre nem magyarázza teljes egészében a vese károsodásának csökkenését.

A legvalószínűbb, hogy sok faktor határozza meg, hogy kialakul-e NO hiány a KVB-ben szenvedő betegben (az eNOS gén polimorfizmusa összefüggésben állhat a vesebetegség romlásával; a KVB állatkísérletes tanulmányai az érendszert és a vese csökkent eNOS expressziójáról számolnak be; a KVB-ban előforduló hiperparathormonizmus is hozzájárulhat a NOS aktivitás csökkenéséhez; a megemelt oxidatív stressz, az NO „elfogásán” keresztül csökkentheti az NO szintet, stb.)

Az urea hatása endotélsejtek L-arg transzportjára és NOS aktivitására

VVE-ben szenvedő betegekben hiányzik, vagy jelentősen csökkent a működő vesecellomány, illetve a NOS által használt endogén L-arg fő forrása a vesékéreg. Bár a VVE-ben szenvedő betegek plazma L-arg koncentrációja általában a normálérték alsó határán van, az értékek még mindig jelentősen az eNOS enzim K_m -je felett vannak, így, ezt az állapotot nem tekinthetjük teljesen az NO termelés szabstrát-hiány miatti következményének, ha csak a plazma L-arg nem tükrözi az intracelluláris L-arg hozzáférhetőséget, például a sejtekbe történő csökkent L-arg transzport miatt.

Kimutatunk, hogy VVE-ben szenvedő betegek plazmájában gátolja az L-arg transzportot endotélsejtekbe in vitro. Ezután különböző szintetikus oldatokat használunk, hogy megkereshessük, az urea plazma mely alkotórészei felelősek az L-arg transzport gátlásáért. Így vizsgálunk az urea hatását ureáz-sokban előforduló koncentrációban rövid (6 óra) és hosszú (7 nap) ideig tartó inkubáció során – mind az L-arg transzportot, mind a NOS aktivitást illetően. Kísérleteink nagy részét HDMVEC sejteken végeztük, de használunk HGEC és BTABC sejteket is.

X. Uremiásokból (PD-kezelt betegkezből és HD-kezelés előtt) nyert plazma (20%-ban adva szintetikus médiumhoz, 6 óra inkubáció után) gátolja az L-arg transzportot endotélsejtekben. A HD kezelés részlegesen megelőzi e gátló hatást.

XI. Uremiában észlelhető koncentrációjú urea gátolja az L-arg transzportot HDMVEC sejtekben, 6 óra inkubáció után. Az urea gátló hatása azonban nem kompetitív jellegű, mivel akut hatásban az urea nem befolyásolja az L-arg transzportot.

XII. Urea 6 óra inkubációs idő alatt még nem, míg 7 nap alatt már gátolja a NOS aktivitást is endotélsejtekben.

Eredményeink alapján a VVE-ben szenvedő betegkezből származó uremiás plazma tartalmaz olyan anyag(oka)t, mely(ek) gátolja(ja)k az L-arg transzportot. A szintetikus oldatokkal végzett kísérleteink az urea szerepét hangsúlyozzák, melynek gátló hatása nem kompetitív jellegű. Megjegyzendő, hogy más transzport-gátló anyagoknak is kell lenniük uremiában, mivel az in vitro használt 20%-os humán plazmában az urea koncentrációja kb. ~5 mM lehetett, és 5 mM ureának nem volt hatása az L-arg transzportra. Elképzelhető, hogy az uremiás plazma egyes in vitro gátló faktorai együttesen, in vivo jelentősebb gátló hatást fejtenek ki az L-arg sejtek általi felvételre.

Az ureával történt 7 napos inkubáció után észlelt eNOS aktivitás csökkenés hátterében nem volt kisebb eNOS mennyiség. Bár az urea már 6 óra inkubáció után is gátolta az L-arg transzportot, valószínűleg több időre van szükség ahhoz, hogy az eNOS szabstrát hozzáférhetősége problémát jelentsen. Mivel a kationos aminosav transzporterek (L-arg transzportot is felelősek) együtt fordulnak elő az eNOS-sal az endotélsejt kaveoláiban, lokális argininhiány léphet fel ebben a sejtmikrokörnyezetben.

Így a megemelt urea szint a vérben elősegítheti a magas vérnyomás kialakulását in vivo, az endotélsejtekbe történő L-arg transzport gátlásán keresztül, és tulajdonképpeni eNOS aktivitás csökkenésén keresztül.

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

Ahhoz, hogy az urea in vivo jelentőségét is láthassuk, krónikusan etetünk egészséges patkányokat magas urea tartalmú diétával, hogy uremiában előforduló plazma urea szinteket kapjunk. Mértük a vérnyomást, a vesefunkciót mind a diétás periódus előtt, mind 7 napos etetés után, amikor az NO rendszert is vizsgáltuk, akut NOS gátlással. Mértük továbbá az urea-etetés hatását a teljesítet NO termelésére, a 24 óra vizellel történő NO_x kiválasztás alapján; a NOS aktivitást a vesékéregben és a kisagyban; illetve a NOS enzim mennyiségét a vesében.

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

Hipotézisünk az volt, hogy a magas extracelluláris urea koncentráció az L-arg transzport gátlása révén intracelluláris L-arg hiányt okoz, és így gátolja az endotélium NO termelését, in vivo. Kísérletünkben azonban nem látnuk erre utaló elváltozást. Eredményeink arra utalnak, hogy in vivo 7 nap alatt a magas plazma urea szint nem okoz módoszerűvel detektálható NOS gátlást egészséges patkányokban. Normál vesefunkció során az endogén NOS-gátló anyagok kiválasztásra kerülnek, és az L-arg szintézise is optimális. Feltételezzük, hogy ha az L-arg ellátás nem megfelelő, és az endogén NOS inhibitorok klirensze csökkent (veseelégtelenségben), együtt az urea gátló hatásával az L-arg transzportra, csökkenthet az NO termelés.

Humán vizsgálatok - IgA nefropátia és hipertónia

A leggyakoribb primer glomerulonefritiszben, az IgA nefropátiában a betegek legnagyobb részében a betegség lassan progresszív és 15-25 év után krónikus veseelégtelenség kialakulása várható. A betegség progressziójában jelentős szerepet játszó kardiovaszkuláris rizikófaktorok közül a mindennapi gyakorlatban a hipertónia korai felismerése és hatékony kezelése az egyik legfontosabb feladat.

A vérnyomáscsökkentés - elsősorban a glomeruláris nyomás csökkentésén keresztül - mérsékli a proteinuriát és így részben ennek következtében a betegség progresszióját. Az ACE-gátlók (és egyes kalcium-csatorna blokkolók, CCB) emellett még jelentős anti proliferatív hatással is rendelkeznek, ezért hipertónia esetén ezek az első válaszlandó vérnyomáscsökkentők. Már normotóniás betegeknek adott kis dózisi ACE gátló is csökkenti a proteinuriát.

Endoteliális vazodilatív anyagok; a dohányzás szerepe

Az endotélium számos mediátor szabadul fel (NO, ET, prostaaglandinok stb.), melyek jelentős endo-, para- és autoerin funkcióval rendelkeznek. Krónikus glomerulonefritiszben, így IgA nefropátiában is, a vese funkció beszűkülésével párhuzamosan egyre több betegben alakul ki magas vérnyomás. A hipertónia tovább fokozza a vesebetegségek progresszióját illetve egyes

vazodilatív anyagok (pl. ET) jelentős sejtproliferatív hatással is rendelkeznek. A vazodilatív mediátorok közül az NO illetve ET vizsgálatát kezdtük meg, mert mind a kettő - a lokális keringésszabályozás mellett - részt vesz a vesékben zajló gyulladásos folyamatokban is. Ismert, hogy a szervezetben keletkezett NO és a vízzellettel ürített NO_x kapcsolatait számos tényező befolyásolhatja (táplálék és ivóvíz NO_x tartalma, fizikai aktivitás, bakteriális éftözöttség, stb.), ezért ezekre a tényezőkre különösen figyeltünk.

Mivel endoteliális-tényezetek vizsgálata során azt találtuk, hogy a dohányfüst gátlója a sejtek NO termelését, ezért a dohányzás és a NO_x ürítés kapcsolatait is vizsgáltuk az IgA nefropátiás betegekben, egészségesekkel összehasonlítva.

XVI. A cGMP és NO_x között észlelt kapcsolatot alapján mindkettő mérése alkalmazásnak látszik a szervezetben termelődött NO megjelölésére.

XVII. A vízzellettel ürített NO_x és a 24 órás vérnyomásmérés átlagai között megfigyelt összefüggés alapján a vérnyomás szabályozásában az NO szerepet játszhat.

XVIII. A dohányzás kapcsán jelentős mennyiségű NO/NO_x jut a szervezetbe, ezért dohányosoknál a vízzellet NO_x alapján nem lehet a szervezet NO termelésére következtetni.

A 24 órás gyűjtött vízzelletből meghatározott NO_x és cGMP között megfigyelt összefüggés alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy mindkettő döntően a szervezetben termelődött NO hatására illetve lebomlásaként keletkezik. Kísérletes glomerulonefritiszben a glomeruláris iNOS indukció és a vízzellettel ürített NO_x mennyisége között nem volt szignifikáns kapcsolat. Az általunk vizsgált IgA nefropátiás betegek vízzellet NO_x illetve cGMP ürítései sem voltak magasabbak a kontroll csoportnál, ami arra utal, hogy a NO_x illetve cGMP elsősorban nem a vese szövetek iNOS aktivitációjából származik.

Esszenciális hipertóniásokban csökken az NO kiváltotta vazodilatáció, mely a szervezetben termelődő NO és vérnyomás közötti kapcsolatra utal. Ezt találtuk IgA nefropátiás betegekben is (a NO_x ürítés és a 24 órás vérnyomásátlagok közötti negatív szignifikáns korreláció).

Ismert, hogy az NO gátlója az ET keletkezését és az ET rövid ideig, hatása elején NO termelődést és így vazodilatációt okoz. Tehát az erek tónusának szabályozásában résztvevő ellentétes hatású mediátorok között is jelentős bioreguláció áll fenn. Valószínűleg ennek következténye az egészséges kontrollok vízzellet NO_x és ET ürítés között megfigyelt szignifikáns kapcsolat. Ezt azonban az IgA nefropátiás betegekben nem tudtuk kimutatni, még normális

vesefunkciójú betegekben sem. Ez arra utal, hogy IgA nefropátiában a vazoktív mediátorok termelődése és összehangolt működése már a betegség korai stádiumában károsodik. Ezt támasztja az IgA nefropátiásokban megfigyelt szignifikánsan emelkedett ET/NO_x hányados is.

A cigaretta égése során jelentős mennyiségben különböző nitrogén származékok keletkeznek, melyek a légutakon keresztül bejuthatnak a szervezetbe. Mind a dohányos egészséges, mind a dohányos IgA nefropátiásokban észlelt szignifikánsan megnövekedett NO_x kiválasztás, illetve a vizelet NO_x és cGMP között hiányzó összefüggés alapján feltételezzük, hogy a dohányzás kapcsolatban jelentős mennyiségű NO vagy NO_x jut a szervezetbe.

Ambuláns vérnyomásmonitorozás

A 24 órás vérnyomásmonitorozás (ABPM) teljesebb képet ad a napi vérnyomás változásról mint az eseti mérések, illetve eredményei a célszervi/károsodásokkal is szorosabb kapcsolatot mutatnak az eseti méréseknél. A vérnyomásmonitorozás alapján új jelenségeket írtak le, mint például a fehérkéopény hipertóniát vagy a dipper jelenséget. Betegeink nagyszámú ABPM vizsgálattal az IgA nefropátiások vérnyomásának jellegzetességeiről gyűjtöttünk adatokat.

XIX. Az ABPM vizsgálat alapján a fehér-kéopény hipertónia előfordulási gyakorisága az IgA nefropátiás betegekben hasonló az átlag populációival. A non-dipperek illetve fehérkéopény hipertóniát mutató normotóniás IgA nefropátiás betegek vesefunkciójának romlása gyorsabb.

Eredményeink alapján az ambuláns vérnyomásmonitorozás szükségesnek látszik a szekunder, renoparenchimás hipertóniák, így az IgA nefropátiások hipertóniájának korai felismerésében és kezelésében is. Az IgA nefropátiában a kialakuló magasvérnyomás egyik előjele lehet a napszaki vérnyomásingadozás megszűnése. Mások megfigyelései szerint is, krónikus glomerulonefritiszben, ha az éjszakai vérnyomáscsökkenés elmarad, a kreatinin klirensz csökkenése gyorsabb. A napjainkban használt antihipertenzív gyógyszerek nem tudják a vérnyomás napszaki ritmusát helyreállítani.

Terápia

Az irodalomból ismert, hogy az ACE inhibitorok és egyes CCB-k renoprotektív hatása kifejezettebb, mint a más hatástani csoportba tartozó, de a szisztémás vérnyomást ugyanolyan hatékonyan csökkentő antihipertenzívumoké. Az azonos hatás csoportba tartozó, de eltérő farmakokinetikájú gyógyszerek összehasonlítására csak rövidtávú vizsgálatok ismertek.

XX. Hipertónia esetén az IgA nefropátia progressziója a 24 órás vérnyomásmonitorozás eredményeire alapozott gyógyszerkezeléssel, illetve hosszabb hatásstartamú ACE-gátló illetve CCB adásával jobban mersékelhető.

Egy nemrég megjelent metaanalízisből ismert, hogy a különböző támadásponti vérnyomáscsökkentők (ACE gátlók, CCB-k, béta-blokkolók stb.) azonos vérnyomáscsökkentő hatás mellett nem egyforma mértékben befolyásolják a krónikus glomerulonefritiszben szenvedők proteinnuriáját. Adataink szerint a hosszabb ideig ható (naponta csak 1-2x adandó) ACE gátlók és CCB-k használatával mind a proteinnuria mértéke mind a vesebetegség progressziója lassítható volt. A hosszabb hatású antihipertenzív szerek kedvező hatásáért valószínűleg a jobb vérnyomásprofil, illetve a kevesebb alkalmammal szükséges gyógyszerbevitelből származó jobb compliance lehet a felelős.

ZÁRSÓ

Az egyszeri, többszöri, vagy netán folyamatos vesekárosító hatások révén, amikor a vese kompenzációs mechanizmusai kimerülnek, vesefunkció károsodás jön létre. Ez a károsodás NO-hiányhoz vezet, akkor is, ha a kezdeti vesebetegség NO-türelmelődéssel jár (pl. immun-mediált glomerulonefritisz akut fázisában). Az NO-hiány viszont további vesefunkció károsodást eredményez, ami beindít egy ördögi kört: a vesebetegség progresszióját (ami természetesen más, itt részletesen nem említett faktorok is befolyásolhat). A progresszió KVB-hez, hipertónia kialakulásához vezet, melyek végül VVE-be torkolhatnak. E progresszív folyamat megismerése és befolyásolása a nefrológia kulcsfeladata.

KÖSZÖNETNYILVÁNTÁS

Köszönetet mondok elsősorban a JÓISTENNEK, hogy végig segített utamon, illetve Édesanyámnak, Édesapámnak, Hígyomnak és Nagymamámnak, akik lehetőséget adtak és biztosítottak munkáimhoz.

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

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

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

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

A SZERZŐ ÉRTEKEZÉSSEL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓI

Közlemények

Angol nyelvű

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

Magyar nyelvű

9. Kovács Tibor, Wagner László, Vas Tibor, Schmelczer Matild, Kocsis Béla, Nagy Judit: A nitrogén-monoxid, endotelin és a vényomás kapcsolata IgA nephropathias betegekben
Magy Belorv Arch, 1998; 51(1): 9-16.
10. Nagy Judit, Witmann István, Wagner László, Eugene G. DeMaster, Pamela Schultz, Leopoldo Raju: A cigarettafüstben levő szabadgyökök okozta endotélis károsodás
Magy Belorv Arch, 1998; 51(1): 43-49.

11. Wittmann István, **Wagner László**, Kátai József, Kassai Gábor, Mazák István, Nagy Judit: Az inzulin gátló hatása trombociták ATP szekréciójára. *Magy Belorv Arch*, 1998; 51(1): 61-65.
12. Wagner Zoltán, Wittmann István, Póó László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Glükóz szabad gyök képződése hidroxil szabad gyök jelenlétében. *Diabetologia Hungarica* 1998; 4: 205-211.
13. Wagner Zoltán, Wittmann István, Póó László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Az arginin glikációjának szabad gyökös mechanizmusa. *Hypertonia és Nephrologia*, 1999; 3: 194-198.
14. Wittmann István, Wagner Zoltán, **Wagner László**, Mazák István, Nagy Judit: A nem-enzimatisz glikáció szerepe az öregedés, az ateroszklerózis és a diabeteses nephropathia pathophyziológiájában és klinikai képiének kialakulásában (felkért összefoglaló). *Diabetologia Hungarica*, 1999; 7: 9-21.
15. **Wagner László**, Wittmann István, Kovács Tibor, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Vas Tibor, Csiky Botond, Molnár Gergő, Nagy Judit: Az L-arginin anyagszere lehetőséges útvonalai. *Hypertonia és Nephrologia, közlésre elfogadva* (2002)
16. **Wagner László**, Wittmann István, Kovács Tibor, **Wagner Zoltán**, Mazák István, Vas Tibor, Csiky Botond, Molnár Gergő, Nagy Judit: Az L-arginin adásának és megszorításának hatása egészséges és beteg vesére. *Hypertonia és Nephrologia, közlésre elfogadva* (2002)
17. **Wagner László**, Hoey John G, Erdelyi Aaron, Boegehold Matthew A, Baylis Chris: A nitrogén monoxid rendszer fokozottabb pátkány mezentériumából származó venuláris endothelsejt tenyészeten, mint az arterioláris oldalon. *Hypertonia és Nephrologia, közlésre benyújtva* (2002)
- Kongresszusi összefoglalók, absztrakt publikációk**
- Angol nyelvű**
18. László Wagner, Tibor Kovács, Béla Kocsis, Matild Schmelzer, Judit Nagy: Relationship between ambulatory blood pressure monitoring and vasoactive mediators in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: A99.
19. Tibor Kovács, Tibor Vas, László Wagner, Judit Nagy: Ambulatory blood pressure monitoring: new possibility of the diagnosis and care of hypertension in patients with IgA nephropathy. *Przegled Lekarski* 1996; 53(S2): 104.
20. László Wagner, István Wittmann, Tamás Koszegi, József Kátai, Judit Nagy: The possible role of hyperinzulinemia in the development of diabetic nephropathy. *Nephrology* 1997; 3(S1): S259.
21. Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, Judit Nagy: Slowing down of the progression of IgA nephropathy after ambulatory blood pressure monitoring-guided blood pressure treatment. *Nephrology* 1997; 3(S1): S355.
22. István Wittmann, Tamás Koszegi, József Kátai, László Wagner, Márta Molnár, Judit Nagy: Inzulin-induced nitric oxide and superoxide free radical production of human platelets. *Diabetologia* 1997; 40(S1): A144.
23. Judit Nagy, László Wagner, Tibor Vas, Tamás Szelestei, Tibor Kovács: Comparison of short- and long-acting angiotensin converting enzyme inhibitors and calcium channel blockers on the progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 319A.
24. Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, Tamás Szelestei, Judit Nagy: The connection between antihypertensive therapy and progression of IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1998; 31(3): A23.
25. László Wagner, István Wittmann, József Kátai, Béla Melegh, Judit Nagy: The effect of cigarette smoke on the protein components of endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(6): A52.
26. József Kátai, István Wittmann, László Wagner, Béla Melegh, Judit Nagy: Protein degradation in platelets caused by cigarette smoke. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(6): A52.
27. László Wagner, István Wittmann, József Kátai, Béla Melegh, Judit Nagy: Does cigarette smoke affect the protein components of endothelial cells? *Aktuality v nefrologii* 1998; 4(1): 54.
28. István Mazák, István Wittmann, László Wagner, Zoltán Wagner, Judit Nagy: Smoke inhibits bradykinin-induced calcium influx in endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: A10.
29. László Wagner, Chris Baylis, Matthew A. Boegehold: Arteriole-venular differences in the nitric oxide pathway in cultured rat mesenteric endothelial cells. *FASEB Journal* 2000; 14: A117.
30. László Wagner, Jeff M Sands, Chris Baylis: Cultured endothelial cells express urea transporters which influence membrane L-arginine transport. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 48A.
31. István Mazák, István Wittmann, László Póó, Zoltán Wagner, Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, József Belágyi, Judit Nagy: Role of iron and methylglyoxal in diabetic nephropathy. In vitro study using red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: A74.

Magyar nyelvű

32. **Wagner László**, Kovács Tibor, Kocsis Béla, Schmelzer Matild, Nagy Judit: A vérnyomás és a vasoactiv mediátorok összefüggése IgA nephropathiában
Magy Belorv Arch 1996; 49(S1): 48.
33. Kovács Tibor, Vas Tibor, Szelestei Tamás, Csiky Botond, **Wagner László**: Rövid- és hosszúhatású ACE gátlók és Ca-csatorna blokkolók renoprotektív hatásának összehasonlítása IgA nephropathias betegekben
Hypertonia és Nephrologia 1997; 1(S2): 37.
34. Wittmann István, Kószegi Tamás, Kovács Brigitta, Kátai József, **Wagner László**, Nagy Judit: Az inzulin nitrogén-monoxid és szuperoxid szabadgyök-termelést indukál humán trombocitákban
Diabetologia Hungarica 1998, VI. évf. I. Suppl., 75.
35. **Wagner László**, Kátai József, Wittmann István, Melegh Béla, Nagy Judit: A dohányfüst megváltoztatja az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételét
Hypertonia és Nephrologia 1998; S2(3): 67.
36. Wagner Zoltán, Wittmann István, Pótvó László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Glükóz szabad gyök képződése hidroxil gyök jelenlétében Hypertonia és Nephrologia 1998; S2(3): 69.
37. Kovács Tibor, **Wagner László**, Vas Tibor, Schmelzer Matild, Kocsis Béla, Nagy Judit: Vizelet cGMP és NOx ürítés összehasonlítása IgA nephropathiás betegekben
Hypertonia és Nephrologia 1998; S2 (3): 72.