

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

**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 évekkel-évtizedekkel tolható ki a szükségessé váló művekezelés vagy vese-transzplantáció, illetve lassítható az egész szervezetet érintő tulajdonképpeni öregedési 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 modelljeiben; 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-termelést hiperinzulinémiában,
  - az L-arg nem enzimatis glikációját,
  - a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának hatását,
  - az urea hatását.
- *In vitro* kísérleteink alapján kutatni kívántuk az urea *in vivo* hatását is, állatokban.
- Humán vizsgálatainkban (IgA nefropátiás beteganyagunkban) vizsgálni kívántuk
  - az endoteliális vasoaktív anyagok termelődését,
  - a dohányzás hatását,
  - az ambuláns vérnyomásmonitorozás szerepét a hipertónia diagnózisában és követésében (terápiás döntések befolyásolása),
  - a hosszú hatású ACE-gátlók és Ca-csatorna blokkolók szerepét a hipertónia kezelésében.

### 3. MÓDSZEREK

Sejtek izolálása: Patkány mezentériumából származó arterioláris (RMAEC) és venuláris (RMVEC) endotélsejteket, továbbá disznó aorta endotélsejteket (PAEC) izoláltunk. Sejtenyészet: Az izolálás során nyert endotélsejteket és más endotélsejt fajtákat (HDMVEC - humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejtek, HGEC - humán glomeruláris endotélsejtek, BTAEC - marha thoracalis aorta endotélsejtek) tenyésztettünk. Sejtszámlálás: A sejteket (mobilizálásuk után) Coulter Counter segítségével számláltuk. Trombocitaszuspenziót humán vérelemezkekből készítettünk, izolálás után, detergens segítségével. A sejtlizátumok és szövethomogenizátumok összfehérje tartalmának meghatározása a sejtlizátumokból Lowry módszerének adaptációja alapján történt. A vizelet összfehérje tartalmának mérését Bradford módszere szerint végeztük. Az NO szintetáz (NOS) aktivitást élő sejtekben illetve homogenizált szövetekben az [<sup>3</sup>H]L-arg - [<sup>3</sup>H]L-cit konverzió mérése alapján határoztuk meg. L-arg transzport mérése: Az endotélsejtek [<sup>3</sup>H]L-arg felvételének sebességét mértük. Western blot: Az endotélsejteket vagy patkány szöveteket lizáltuk, fehérjéit homogén SDS-poliakrilamid minigélen elektroforetizáltuk, nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A fehérjék gélre történt egyenlő mértékű felvitelét és transzferét Ponceau vörös festéssel és a β-aktin mennyiségének mérésével vizsgáltuk. Az eNOS-t, iNOS-t, nNOS-t és a β-aktint kemilumineszcenciás módszerrel mutattuk ki, a kapott csíkokat denzitometráltuk. Az L-arg, aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA), szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) és N<sup>G</sup>-monometil-L-arginin (L-NMA) koncentráció mérése a sejtlizátumokból illetve humán plazmából reverz fázisú HPLC-vel történt (prekolumnáris derivatizációval, fluorescens detekcióval, AccQ-Tag módszerrel). Dohányfüst puffer (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 fogyasztását Ellman reagens alkalmazásával mértük. A glükóz és az L-arg egymásrahatásából termelődött szabad gyökök kimutatására elektron spin rezonancia (ESR) és spin trap ESR módszereket használtunk. A mikrocirkulációból származó erek sebési eltávolítása: Patkányokban a vékonybél egy szegmensét és a hozzá tartozó mezentériumot eltávolítottuk, majd mikroszkóp alatt, ugyanolyan rendű pre- és posztkapilláris érágakat izoláltunk. Patkányokat krónikus hólyag- és vaszkuláris kanülökkel láttunk el. A vesefunkciós mérések a következők voltak: glomeruláris filtrációs ráta és renális plazmaáramlás, inulin és para-aminohippursav klírens, 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 (NO<sub>x</sub>) mérése a 24 órás vizeletből a Griess-módszer alkalmazásával történt. Endothelin-t (ET) és cGMP-t vizeletből radioimmunoassay-vel határoztunk meg. Embereken a 24 órás vérnyomás monitorozást oszcillometriás elven működő

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

## ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK (a tézisek római számokkal jelezve)

### *Endotélsejtek intakt L-arg - NO rendszere in vitro*

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

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

A posztkapillárisan folyamatosan termelődő NO hozzájárul az alacsony venuláris vaszkuláris rezisztenciához (ami szükséges a kapillárisok megvédéséhez a nagy hidrosztatikai nyomástól), illetve szerepet játszik a venulafal áteresztőképességének szabályozásában is. Továbbá, a venuláris NO képes átdiffundálni a közeli arteriolákhoz is. Valószínű azonban, hogy elsődleges szerepe a fehérvérsejtek aggregációjának és adhéziójának gátlása. Az alacsony nyíróerő könnyebben lehetővé teszi a fehérvérsejtek kitapadását, amit az NO megakadályoz, a következményesen kialakuló gyulladásos válaszzal 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 hatását 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 nyíróerejű környezetben a tromboembóliák kialakulásának megelőzését szolgálja.

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

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

Sertés aorta endotélsejtek NO-termelését bradikininnel indukáltuk. A sejteket ezután dohányfüst pufferral különböző ideig és különböző koncentrációban kezeltük, 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 endotélsejt 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 produkciót indukáló, agonista-kiváltotta kalcium beáramlás károsodhat az endotélsejtekben az oxidatív stressz hatására.

A GSH nem specifikus scavengerként a legtöbb oxidáló ágens képes elfogni. Így például gátolja a dohányfüstben nagy koncentrációban jelenlevő nitrogén oxididok hatását is. Meglepő, hogy a dohányfüst nagy NO koncentrációja ellenére az endotélsejtekben nem cGMP növekedést, hanem csökkenést okozott. Ennek a magyarázata abban lehet, hogy a dohányfüst-puffer preparálása során a dohányfüst vizes extraktuma kb. 10 percet állt, mielőtt a sejtekkel kapcsolatba került. Ezidő alatt az NO átalakulhatott, hiszen féléletideje oxigén jelenlétében néhány másodperc. Ugyanez lehet a sorsa a dohányfüstnek és az NO-nak is a szervezetben. A dohányfüst inhalálása után a vér vörösvértestjei gyorsan  $\text{NO}_2^-$ -vé, majd  $\text{NO}_3^-$ -á alakítják az NO-t, miközben oxidatív stressz lép fel bennük. Így a tüdőben történő expozíció hatását a vörösvértestek transzportálják a tüdőtől távoli szervekbe is. Természetesen ezek a szabad gyökös folyamatok elsősorban a vörösvértestekkel közvetlen kapcsolatba kerülő endotélsejteket érintik. Az oxidatív stressz miatt a hem kiszabadulhat

a vörösvértestekből és a szabad gyökök direkt 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 keresztkötéseket létesít a fehérjék aminocsoportjai 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 aktivitása megváltozik, például a NOS inaktíválódhat.

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 degenerációt (szabad gyök-kiváltotta degradáció, és keresztkötések létrejötte, interbridging, azaz nagymolekulasúlyú termékek képződése) okozó hatásának kimutatására (amely minden valószínűség szerint érinti az NO-cGMP rendszert is) natív poliakrilamid gél elektroforézist használtunk: SB-vel kezelt sertés aorta endotélsejtek és humán trombociták fehérjéit vizsgáltuk.

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

Az aktív eNOS izozim dimer alakban fordul elő (molekulasúlya 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 eltűnését észleltük a 270 kD molekulasúlyú tartományban. A fehérje eltűnése a dohányfüst koncentrációjától, illetve az expozíció idejétől függött, mely kivédhető volt GSH kezeléssel, és némileg fokozható volt GSSG hozzáadásával. Feltételezzük, hogy a megfigyelt fehérje-eltűnés kapcsolatba hozható az eNOS enzim gátlásával, amire előző kísérletünkben a cGMP termelés csökkenése utalt.

#### ***A trombociták szabad gyök termelése hiperinzulinémiában***

Hyperinzulinaemia alakulhat ki csökkent glükóz toleranciában, kettes típusú diabetes mellitusban, illetve inzulin adagolás kapcsán. Az inzulin NO termelést indukál trombocitákban. Továbbá, az inzulin gátolja a vérlemezke ATP kibocsátását. Az inzulin ezen hatását a NOS enzim szubsztrát L-arg felerősíti. Ezek alapján valószínűnek tartottuk, hogy az inzulin gátló hatásának intracelluláris hírvivője, a vérlemezke ATP-kibocsátás vonatkozásában, az NO. Kíváncsiak 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 peroxinitritet képez, mely a luminollal reagálva kemilumineszcenciát hoz létre). Ezután L-NAME-mel illetve szuperoxid dizmutázzal koinkubáltuk 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-NAME, 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 egymásrahatásából 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 igazoltuk az L-arg + glükóz reakció hőmérséklet függését is. E módszer érzéketlensége miatt az L-arg + glükóz reakció testhőmérsékleten nem detektálható.
- VIII. Az L-arg + glükóz reakciót a vas elsősorban redukált, ferro 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 katalízist a ferri-ferro redukciót gátló dezferrioxamin megakadályozza, így feltételezhetjük, hogy a folyamat melléktermékeként szuperoxid anion szabad gyök is termelődik, hiszen a ferro vas képes az oxigént redukálni. Az így termelt szuperoxid anion szabad gyök hatástalaníthatja az inzulin-NO szignált. Az 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 glukóz jelenlétében glukóz 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 vérátáramlás szabályozása. A NOS-gátló hatású arginin analógok plazmában történő felhalmozódása csökkent eNOS aktivitást eredményezhet. Az NO hiánynak nagy valószínűséggel szerepe van a veseelégtelenség következtében másodlagosan kialakuló magas vérnyomásban.

Kíváncsiak voltunk, hogy a KVB-ben szenvedő betegek plazmájának is van-e eNOS-gátló hatása, ami hozzájárulhat a magas vérnyomáshoz. Humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejt (HDMVEC) tenyészetben 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 órással inkubáció után variábilis hatású HDMVEC NOS aktivitására. A plazma csökkenti a sejtek NOS aktivitását azokban az esetekben, ahol az ADMA koncentráció magas a beteg plazmájában, azonban nem befolyásolja az endotélsejtek L-arg transzportját, eNOS enzim mennyiségét és nem jelentősen befolyásolja a sejtek L-arg koncentrációját. Így az ADMA részben felelős lehet az eNOS aktivitás gátlásáért endotélsejt tenyészetben, de ebben más faktor is szerepet játszik.



A betegekben származó plazmát ötszörösére hígítottuk, így az inkubáló oldat ADMA koncentrációja  $\sim 0,5 \mu\text{M}$  volt. Ez a koncentráció *in vitro* nem befolyásolja az eNOS aktivitást; *in vivo* azonban valószínű, hogy a megemelkedett plazma ADMA szint részt vesz az eNOS gátlásában, és markere is lehet más, az eNOS-t gátló anyagok felhalmozódásának.

Miért csak bizonyos betegekben magasabb a plazma ADMA szint? A metilargininek lebontását végző enzim aktivitásának gátlása növelheti az ADMA szintjét. Az endotélsejtekben megtalálhatók az S-adenozilmetionin-függő metiltranszferázok, melyek azokat a fehérjéket metilálják, melyekből következményesen ADMA és SDMA keletkezik a lebomlás során. E metiltranszferázok szintje endotélsejtekben LDL-koleszterin hatására felregulálódik, és így megemelkedett 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 klirenszének csökkenése.

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 érrendszer és a vese csökkent eNOS expressziójáról számolnak be; a KVB-ban előforduló hiperparatireoidizmus is hozzájárulhat a NOS aktivitás csökkenéséhez; a megemelkedett 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 veseállomány, illetve a NOS által használt endogén L-arg fő forrása a vesekéreg. 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 szubsztrát-hiány miatti következményének, hacsak a plazma L-arg nem tükrözi az intracelluláris L-arg hozzáférhetőséget, például a sejtekbe történő csökkent L-arg transzport miatt.

Kimutattuk, hogy VVE-ben szenvedő betegek plazmája gátolja az L-arg transzportot endotélsejtekbe *in vitro*. Ezután különféle szintetikus oldatokat használtunk, hogy megkereshessük, az urémiás plazma mely alkotórészei felelősek az L-arg transzport gátlásáért. Így vizsgáltuk az urea hatását urémiásokban 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 használtunk HGEC és BTAEC sejteket is.

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

Eredményeink alapján a VVE-ben szenvedő betegekből származó urémiás plazma tartalmaz olyan anyago(ka)t, mely(ek) gátolja(ják) 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 urémiában, 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 urémiás plazma egyes in vitro gátló faktoraai együttesen, in vivo jelentősebb gátló hatást fejtenek ki az L-arg sejtek általi felvételére.

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 szubsztrát hozzáférhetősége problémát jelentsen. Mivel a kationos aminosav transzporterek (L-arg transzportért is felelősek) együtt fordulnak elő az eNOS-sal az endotélsejt kaveoláiban, lokális argininhiány léphet fel ebben a sejt-mikrokörnyezetben.

Így a megemelkedett 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 etettünk egészséges patkányokat magas urea tartalmú diétával, hogy urémiában 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 teljestest NO termelésére, a 24 órás vizelettel történő NO<sub>x</sub> kiválasztás alapján; a NOS aktivitást a vesekéregben és a kisagyban; illetve a NOS enzim mennyiségét a vesében.

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

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 láttunk erre utaló elváltozást. Eredményeink arra utalnak, hogy in vivo 7 nap alatt a magas plazma urea szint nem okoz módszereinkkel 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 klírensze csökkent (veseelégtelenségben), együtt az urea gátló hatásával az L-arg transzportra, csökkenhet az NO termelés.

#### ***Humán vizsgálatok - IgA nefropátia és hipertónia***

A leggyakoribb primér glomerulonefritiszben, az IgA nefropátiában a betegek legnagyobb részében a betegség lassan progrediál 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 antiproliferatív hatással is rendelkeznek, ezért hipertónia esetén ezek az első választandó vérnyomáscsökkentők. Már normotóniás betegeknek adott kis dózisú ACE gátló is csökkenti a proteinuriát.

#### **Endotelialis vasoaktív anyagok; a dohányzás szerepe**

Az endotélből számos mediátor szabadul fel (NO, ET, prosztaglandinok stb.), melyek jelentős endo-, para- és autocrin funkcióval rendelkeznek. Krónikus glomerulonefritiszekben, így IgA nefropátiában is, a vesefunkció beszűkülésével párhuzamosan egyre több betegben alakul ki magas vérnyomás. A hipertónia tovább fokozza a vesebetegségek progresszióját illetve egyes

vazoaktív anyagok (pl. ET) jelentős sejtproliferatív hatással is rendelkeznek. A vazoaktív mediátorok közül az NO illetve ET vizsgálatát kezdtük meg, mert mind a kettő - a lokális keringésszabályozás mellett - részt vesz a vesékben zajló gyulladásoz folyamatokban is. Ismert, hogy a szervezetben keletkezett NO és a vizelettel ürített NO<sub>x</sub> kapcsolatát számos tényező befolyásolhatja (táplálék és ivóvíz NO<sub>x</sub> tartalma, fizikai aktivitás, bakteriális efrtözöttség, stb.), ezért ezekre a tényezőkre különösen figyeltünk.

Mivel endotélsejt-tenyészetek vizsgálata során azt találtuk, hogy a dohányfüst gátolja a sejtek NO termelését, ezért a dohányzás és a NO<sub>x</sub> ürítés kapcsolatát is vizsgáltuk az IgA nefropátiás betegekben, egészségesekekkel összehasonlítva.

XVI. A cGMP és NO<sub>x</sub> között észlelt kapcsolat alapján mindkettő mérése alkalmasnak látszik a szervezetben termelődött NO megítélésére.

XVII. A vizelettel ürített NO<sub>x</sub> 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<sub>x</sub> jut a szervezetbe, ezért dohányosoknál a vizelet NO<sub>x</sub> alapján nem lehet a szervezet NO termelésére következtetni.

A 24 órás gyűjtött vizeletből meghatározott NO<sub>x</sub> 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 vizelettel ürített NO<sub>x</sub> mennyisége között nem volt szignifikáns kapcsolat. Az általunk vizsgált IgA nefropátiás betegek vizelet NO<sub>x</sub> illetve cGMP ürítései sem voltak magasabbak a kontroll csoportnál, ami arra utal, hogy a NO<sub>x</sub> illetve cGMP elsősorban nem a veseszövetek iNOS aktivációjából 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<sub>x</sub> ürítés és a 24 órás vérnyomásátlagok közötti negatív szignifikáns korrelációt).

Ismert, hogy az NO gátolja 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 következménye az egészséges kontrollok vizelet NO<sub>x</sub> 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 vasoaktív mediátorok termelődése és összehangolt működése már a betegség korai stádiumában károsodik. Ezt támogatja az IgA nefropátiásokban megfigyelt szignifikánsan emelkedett ET/NO<sub>x</sub> 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<sub>x</sub> kiválasztás illetve a vizelet NO<sub>x</sub> és cGMP között hiányzó összefüggés alapján feltételezzük, hogy a dohányzás kapcsán jelentős mennyiségű NO vagy NO<sub>x</sub> jut a szervezetbe.

### **Ambuláns vérnyomásmonitorozás**

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

XIX. Az ABPM vizsgálat alapján a fehér-köpeny hipertónia előfordulási gyakorisága az IgA nefropátiás betegekben hasonló az átlag populációéval. A non-dipperek illetve fehérvérnyomás 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 vérnyomáscsökkenés 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 hatáscsoportba tartozó, de eltérő farmakokinetikájú gyógyszerek összehasonlítására csak rövidtávú vizsgálatok ismertek.

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

Egy nemrég megjelent metaanalízisből ismert, hogy a különböző támadáspontú vérnyomáscsökkentők (ACE gátlók, CCB-k, béta-blokkolók stb.) azonos vérnyomáscsökkentő hatás mellett nem egyforma mértékben befolyásolják a krónikus glomerulonefritiszben szenvedők proteinuriáját. Adataink szerint a hosszabb ideig ható (naponta csak 1-2x adandó) ACE gátlók és CCB-k használatával mind a proteinuria mértéke mind a vesebetegség progressziója lassítható volt. A hosszabb hatású antihipertenzív szerek kedvező hatásáért valószínűleg a jobb vérnyomásprofil, illetve a kevesebb alkalommal 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-túltermeléssel jár (pl. immun-mediált glomerulonefritisz akut fázisában). Az NO-hiány viszont további vesefunkció károsodást eredményez, ami beindít egy ördögi kört: a vesebetegség progresszióját (amit természetesen más, itt részletesen nem említett faktorok is befolyásolnak). A progresszió KVB-hez, hipertónia kialakulásához vezet, melyek végül VVE-be torkollhatnak. E progresszív folyamat megismerése és befolyásolása a nefrológia kulcsfeladata.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

## A SZERZŐ ÉRTEKEZÉSEL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓI

### *Közlemények*

#### Angol nyelvű

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

#### Magyar nyelvű

9. Kovács Tibor, **Wagner László**, Vas Tibor, Schmelczler Matild, Kocsis Béla, Nagy Judit: A nitrogén-monoxid, endothelin és a vérnyomás kapcsolata IgA nephropathias betegekben  
*Magy Belorv Arch*, 1998; 51(1): 9-16.
10. Nagy Judit, Wittmann István, **Wagner László**, Eugene G. DeMaster, Pamela Schultz, Leopoldo Raij: A cigarettafüstben levő szabadgyökök okozta endotélsejt károsodás  
*Magy Belorv Arch*, 1998; 51(1): 43-49.



11. Wittmann István, **Wagner László**, Kátai József, Kassai Gábor, Mazák István, Nagy Judit: Az inzulin gátló hatása trombociták ATP szekréciójára  
Hypertonia és Nephrologia, 1998; 51(1): 61-65.

12. Wagner Zoltán, Wittmann István, Póto 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, Póto László, **Wagner László**, Belágyi József, Nagy Judit: Az arginin glikációjának szabad gyökös mechanizmusa  
Hypertonia és Nephrologia, 1999; 3: 194-198.

14. Wittmann István, Wagner Zoltán, **Wagner László**, Mazák István, Nagy Judit: A nem-enzimatisz glikáció szerepe az öregedés, az ateroszklerózis és a diabeteses nephropathia pathophysiológiájában és klinikai képének kialakulásában (felkért összefoglaló)  
Diabetologia Hungarica, 1999; 7: 9-21.

15. **Wagner László**, Wittmann István, Kovács Tibor, Wagner Zoltán, Mazák István, Vas Tibor, Csiky Botond, Molnár Gergő, Nagy Judit: Az L-arginin anyagcsere lehetséges útvonalai  
*Hypertonia és Nephrologia, közlésre elfogadva (2002)*

16. **Wagner László**, Wittmann István, Kovács Tibor, Wagner Zoltán, Mazák István, Vas Tibor, Csiky Botond, Molnár Gergő, Nagy Judit: Az L-arginin adásának és megszorításának hatása egészséges és beteg vesére  
*Hypertonia és Nephrologia, közlésre elfogadva (2002)*

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

### **Kongresszusi összefoglalók, absztrakt publikációk**

#### **Angol nyelvű**

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

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

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

21. Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, Judit Nagy: Slowing down of the progression of IgA nephropathy after ambulatory blood pressure monitoring-guided blood pressure treatment  
*Nephrology* 1997; 3(S1): S355.
22. István Wittmann, Tamás Kőszegi, József Kátai, László Wagner, Márta Molnár, Judit Nagy: Insulin-induced nitric oxide and superoxide free radical production of human platelets  
*Diabetologia* 1997; 40(S1): A144.
23. Judit Nagy, László Wagner, Tibor Vas, Tamás Szelestei, Tibor Kovács: Comparison of short- and long-acting angiotensin converting enzyme inhibitors and calcium channel blockers on the progression of IgA nephropathy  
*J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 319A.
24. Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, Tamás Szelestei, Judit Nagy: The connection between antihypertensive therapy and progression of IgA nephropathy  
*Am J Kidney Dis* 1998; 31(3): A23.
25. László Wagner, István Wittmann, József Kátai, Béla Melegh, Judit Nagy: The effect of cigarette smoke on the protein components of endothelial cells  
*Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(6): A52.
26. József Kátai, István Wittmann, László Wagner, Béla Melegh, Judit Nagy: Protein degradation in platelets caused by cigarette smoke  
*Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(6): A52.
27. László Wagner, István Wittmann, József Kátai, Béla Melegh, Judit Nagy: Does cigarette smoke affect the protein components of endothelial cells?  
*Aktuality v nefrologii* 1998; 4(1): 54.
28. István Mazák, István Wittmann, László Wagner, Zoltán Wagner, Judit Nagy: Smoke inhibits bradykinin-induced calcium influx in endothelial cells  
*Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: A10.
29. László Wagner, Chris Baylis, Matthew A. Boegehold: Arteriolar-venular differences in the nitric oxide pathway in cultured rat mesenteric endothelial cells  
*FASEB Journal* 2000; 14: A117.
30. László Wagner, Jeff M Sands, Chris Baylis: Cultured endothelial cells express urea transporters which influence membrane L-arginine transport  
*J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 48A.
31. István Mazák, István Wittmann, László Pótó, Zoltán Wagner, Tibor Kovács, László Wagner, Tibor Vas, József Belágyi, Judit Nagy: Role of iron and methylglyoxal in diabetic nephropathy. In vitro study using red blood cells.  
*Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: A74.

**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, Kőszegi Tamás, Kovács Brigitta, Kátai József, Wagner László, Nagy Judit:** Az inzulin nitrogén-monoxid és szuperoxid szabadgyök-termelést indukál humán trombocitákban  
Diabetologia Hungarica 1998, VI. évf. I. Suppl., 75.

**35. Wagner László, Kátai József, Wittmann István, Melegh Béla, Nagy Judit:** A dohányfüst megváltoztatja az endotélsejtek és trombociták fehérjeösszetételét  
Hypertonia és Nephrologia 1998; S2(3): 67.

**36. Wagner Zoltán, Wittmann István, Póto 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.