

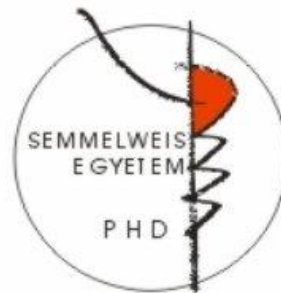
A nitrogén-monoxid szintáz enzimek vizsgálata hipoxia által kiváltott kórképekben

Doktori értekezés

Dr. Rusai Krisztina

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Attila, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Fekete György egyetemi tanár, az
MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens, Ph.D.
Dr. László Lajos egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2008

1. Tartalomjegyzék

2. Rövidítések jegyzéke	5
3. Összefoglalás	7
4. Summary.....	9
5. Bevezetés, irodalmi áttekintés	11
5.1. A NO szintézise, valamint a NO szintázok izoformái és expressziójuk	11
5.2. A NO hatásmechanizmusa és biológiai szerepe	17
5.3. A NO és a vese I/R patomechanizmusának kapcsolata	20
5.3.1. A NO általános szerepe a vesében.....	20
5.3.2. A vese I/R károsodásának általános patomechanizmusa.....	20
5.3.3. A NO hatása és a NO szintáz enzimek expressziója vese I/R-ban.....	23
5.3.4. NO donor molekulák hatása I/R vesekárosodásban	25
5.3.5. Iszkémiás prekondicionálás és a NO rendszer kapcsolata	26
5.4. A NO rendszer és az iszkémia indukálta retinopátiák kapcsolata	27
5.4.1. A koraszülöttek retinopátiájának patogenezise	27
5.4.2. A NO szerepe az iszkémia indukálta angio- és vaszkulogenezisben	27
5.4.2.1. Az eNOS szerepe a koraszülöttek retinopátiájának kialakulásában.....	31
5.4.3. Az eNOS genetikai polimorfizmusai.....	32
5.4.3.1. Az eNOS genetikai polimorfizmusok és a diabéteszes retinopátia összefüggései	32
6. Célkitűzések	34
7. Anyagok és módszerek.....	35
7.1. In vivo vese I/R állatmodell.....	35
7.1.1. A kísérletek során használt állatok	35
7.1.2. Az I/R vesekárosodás műtéti protokollja	35
7.1.3. Kezelési csoportok.....	36
7.2. Szérum kreatinin és karbamid (BUN) mérése	37
7.3. A veseszövetek szövettani vizsgálata	37
7.4. TUNEL festés	38
7.5. RT-PCR vizsgálatok	38
7.5.1. RNS izolálás	38

7.5.2. Komplementer DNS (cDNS) szintézis.....	38
7.5.3. Szemikvantitatív PCR reakciók (GAPDH, nNOS, iNOS, eNOS)	39
7.6. Western Blot	40
7.6.1. Minta előkészítés	40
7.6.2. Antitestek.....	40
7.6.3. SDS-PAGE	41
7.6.4. Blottolás.....	41
7.6.5. Immunoblottolás.....	41
7.6.6. Detektálás	42
7.7. Allélspecifikus PCR vizsgálatok	42
7.7.1. Mintagyűjtés	42
7.7.2. Betegcsoportok.....	42
7.7.3. DNS izolálás.....	43
7.7.4. Az eNOS T ⁻⁷⁸⁶ C és 27-bp repeat polimorfizmusok detektálása.....	43
7.8. Statisztikai analízis	46
8. Eredmények	48
8.1. Az L-arginin és 7-NI kezelés hatása a vese I/R károsodására	48
8.1.1. Vesefunkciós paraméterek.....	48
8.1.2. A vese szövettani vizsgálata	50
8.1.3. TUNEL-festés.....	51
8.1.4. A NOS izoformák mRNS és fehérje expressziója.....	52
8.1.4.1. Az I/R hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára	52
8.1.4.2. Az L-arginin hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára	53
8.1.4.3. A 7-NI hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára	53
8.2. Az eNOS 27-bp repeat és T ⁻⁷⁸⁶ C polimorfizmusok gyakorisága és a koraszülöttek retinopátiája közötti kapcsolat	59
9. Megbeszélés	62
9.1. A NOS izoformák expressziójának változása vese iszkémia/reperfúziós károsodásban	62

9.2. Az L-arginin hatása vese iszkémia/reperfúziós károsodásban	64
9.3. A 7-NI hatása vese iszkémia/reperfúziós károsodásban.....	67
9.4. Az eNOS genetikai polimorfizmusok és a koraszülöttek retinopátiájának összefüggései	69
10. Eredmények összefoglalása	72
10.1. A NOS izoformák expressziójának változása vese iszkémia/reperfúziós károsodás során.....	72
10.2. Az eNOS génpolimorfizmusok és a kis születési súlyú koraszülöttek retinopátiája közötti kapcsolat vizsgálata	73
11. Köszönetnyilvánítás	74
12. Irodalomjegyzék	76

2. Rövidítések jegyzéke

7-NI	7-nitroindazol
Akt	anti-apoptotikus kináz
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
AP-1	aktivátor protein-1
Apaf-1	apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1
BUN	urea nitrogén
cDNS	komplementer DNS
DR	diabéteszes retinopátia
EGF	epidermális növekedési faktor
E2F1	E2F transzkripció faktor 1
cIAP1	apoptózis inhibitoros protein c1
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
GAPDH	glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
HGF	hepatocita növekedési faktor
HSP70	hősokk protein 70
HSP90	hősokk protein 90
ICAM-1	intercelluláris adhézios molekula-1
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor-1
IFN γ	interferon- γ
I κ B α	inhibitoros- κ B kináz α
IL-1	interleukin-1
IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
I/R	iszkémia/reperfúzió
L-NAME	N-nitro-L-arginin-metil-észter
L-NNA	N-nitro-L-arginin
MCP-1	fő kemoattraktáns protein-1
NF- κ B	nukleáris faktor- κ B

NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF	trombocita-eredetű növekedési faktor
PECAM-1	trombocita/endoteliális adhéziós molekula1
PKA	protein-kináz A
PKB	protein-kináz B
ROP	koraszülöttek retinopátiája
RT	reverz transzkripció
sGC	szolubilis guanilat-cikláz
TNF α	tumor nekrosis factor- α
TGF- β	transzformáló növekedési faktor- β
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling assay
VCAM-1	vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
XIAP	X kromoszóma kapcsolt apoptózis inhibitor protein

3. Összefoglalás

Az iszkémia indukálta patofiziológiai folyamatok számos klinikai kórkép kialakulásában játszanak jelentős szerepet, így az iszkémiás szervkárosodások kiemelkedő mértékben járulnak hozzá a betegek morbiditásához és mortalitásához.

A nitrogén-monoxid (NO) az emlős szervezetben termelődő multifunkcionális jelátvivő molekula, mely többek között központi szerephez jut a hipoxiára/iszkémiára válaszként megjelenő adaptációs, valamint patológias folyamatokban.

A NO szintézisét az ún. nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim végzi, melynek három különböző - neuronális, indukálható, illetve endoteliális - izoformája létezik.

A NO különböző patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepe, mivel önálló receptorral nem rendelkezik, alapvetően attól függ, hogy melyik izoforma szintetizálja, illetve milyen más mediátorok vannak jelen a környezetében.

Jelen munkánk célkitűzése az volt, hogy vizsgáljuk a NOS enzim izoformáinak viselkedését és hatását különböző hipoxia/iszkémia indukálta kórképekben.

Vizsgálataink első részében a NO szintézis szubsztrátjának, az L-argininnek, illetve a neuronális NOS (nNOS) szelektív gátlásának hatását vizsgáltuk patkányok iszkémia/reperfúzió (I/R) indukálta vesekárosodásában.

Eredményeink azt mutatták, hogy az L-arginin kezelés annak ellenére, hogy nem változtatta meg a szöveti károsodás mértékét, illetve a vesefunkciós paraméterek szintjét, megemelte mindhárom NOS izoforma expresszióját a vesében.

A szelektív nNOS gátlószerekkel, 7-nitroindazollal (7-NI) végzett kezelést követően azt találtuk, hogy a 7-NI sem változtatta meg a posztiszkémiás vesekárosodás mértékét. Ugyanakkor a 7-NI kezelés megemelte az indukálható NOS (iNOS) expresszióját a veseszövetben.

A vese I/R során végzett vizsgálataink alapján az L-arginin kezelés posztiszkémiás károsodásra kifejtett hatása részben a NO rendszeren keresztül valósul meg, de nem játszik központi szerepet a károsodás kivédésében. Eredményeink továbbá utalnak arra, hogy a nNOS izoforma nem játszik központi szerepet a vese I/R károsodás patomechanizmusában.

Az endoteliális NOS (eNOS) izoforma által termelt NO az érújdonképződés egyik legfontosabb effektor molekulája.

A koraszülöttek retinopátiája (ROP) a kissúlyú koraszülötteket érintő egyik súlyos perinatális szövődmény, mely a retina kóros neovaszularizációjával jár.

Munkánk második felében a csökkent NO termeléssel járó eNOS 27-bp repeat és T⁻⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmusok előfordulását vizsgáltuk ROP miatt kezelt, illetve ROP miatt nem kezelt kissúlyú koraszülöttekben.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a 27-bp repeat genetikai polimorfizmus hordozása egyéb kockázati tényezőktől függetlenül hozzájárulhat a ROP kialakulásához, megerősítve ezzel az eNOS angiogenezisben betöltött szerepét.

Ugyanakkor nem találtunk összefüggést az eNOS T⁻⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmus és a ROP megjelenése között.

4. Summary

The ischemia induced pathological conditions significantly contribute to the mortality and morbidity statistics. Nitric oxide (NO) is a gaseous multifunctional molecule playing a central role in the pathophysiology of different hypoxia/ischemia induced diseases.

NO is synthesized from L-arginine by three different isoforms of NO synthases (NOS): namely the neuronal, inducible and endothelial isoforms. The effect of NO mainly depends on its concentration, the NOS isoform and which mediators are present in its environment.

The aim of our present work was to investigate the effect of the NOS isoforms in different hypoxia/ischemia induced diseases.

In the first part of our study we examined the effect of L-arginine, the substrate of NO synthesis and the selective neuronal NOS (nNOS) inhibitor 7-nitroindazole (7-NI) on the ischemia/reperfusion (I/R) injury of the rat kidney.

Our results have demonstrated that L-arginine treatment did not have any effect on tissue injury and renal function parameters, whereas it increased significantly the expression of all NOS isoforms in the renal tissue.

Treatment with 7-NI did not change either the rate of kidney injury or the renal function parameters. On the other hand, 7-NI increased the expression of the inducible NOS (iNOS) in the postischemic kidney.

Our findings indicate that L-arginine has a significant influence on the NO system of the ischemic kidney but it has no significant role in the protection from renal ischemic injury. Furthermore, our results suggest that nNOS does not have a central role in renal I/R injury.

Endothelial NOS (eNOS) is one of the main effectors of angiogenesis in mammalian systems. Retinopathy of prematurity (ROP) is a severe perinatal complication affecting mostly low birth weight infants leading to the abnormal neovasculogenesis of the retina.

In the second part of our study we examined if there is any association between the development of ROP and the two genetic polymorphisms of eNOS, 27-bp repeat and T⁻⁷⁸⁶C polymorphisms, both resulting in decreased NO production.

Our study have shown that the 27-bp repeat polymorphism might contribute to the development of ROP, whereas we could not find any association between the eNOS T⁻⁷⁸⁶C polymorphism and ROP.

5. Bevezetés, irodalmi áttekintés

Az iszkémia indukálta összetett funkcionális és biokémiai folyamatok következtében létrejövő sejt- és szervkárosodás számos klinikai kórkép kialakulásában játszik jelentős szerepet. Az iszkémia következtében megjelenő patológiás folyamatok, mint például a szívizom iszkémia, valamint a stroke mind a mai napig a vezető halálokok között vannak.

A vese iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása 70-80%-ban felelős az akut veseelégtelenség kialakulásáért. Sokk és az aortát érintő műtétek kapcsán alakul ki leggyakrabban, illetve elkerülhetetlen velejárója a vese-transzplantációnak (1).

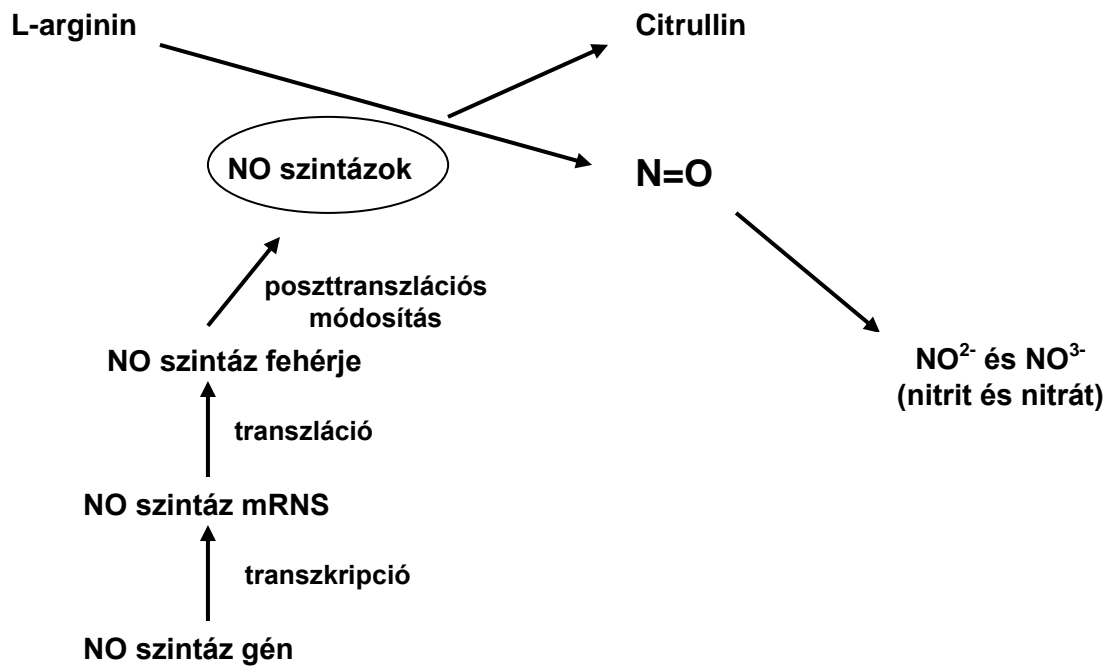
A diabétesz mellitusban, valamint a koraszülöttekben gyakran kialakuló, a retina hipoxiája által indukált proliferatív retinopátia világszerte a látásvesztés egyik legfőbb oka.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az iszkémia mint patológiás folyamat jelentős mértékben hozzájárul számos szerv károsodásához és a betegségek progressziójához.

5.1. A NO szintézise, valamint a NO szintázok izoformái és expressziójuk

A nitrogén-monoxid (NO) L-argininből citrullin átalakulás mellett oxigén jelenlétében keletkező jelátvivő molekula, melynek szintézisét a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim végzi (1. ábra).

A NO szintézisének egyik legfontosabb befolyásoló tényezője a szubsztrát L-arginin mennyisége, melynek termelője a vese. Ezenkívül az oxidációs folyamathoz szükséges kofaktorok a NADPH, FAD, FMN, tetrahydrobiopterin, Ca²⁺-kalmodulin és a hem (2).



1. ábra A nitrogén-monoxid (NO) bioszintézisének útvonala.

A NO L-argininből keletkezik a NOS izoformák működése által. A reakció végterméke a NO és a L-citrullin, mint melléktermék. A NO rövid féléletidővel rendelkezik és gyorsan nitritté és nitráttá oxidálódik (NO^{2-} és NO^{3-}). A NOS enzimek szabályozása transzkripciós és poszt-transzkripciós szinteken valósul meg (3).

A NOS enzimnek jelenleg három izoformája ismert, melyek különböző sejtekben vannak jelen és eltérően szabályozott a működésük.

A neuronális NOS (nNOS vagy NOS I) és az endoteliális NOS (eNOS vagy NOS III) konstitutív enzimek és elsősorban Ca^{2+} -kalmodulin kötés hatására aktiválódnak (4).

Az eNOS aktivációjához foszforilációja és a hősokk protein 90-nel (HSP90) való interakciója is szükséges (5,6). Foszforilációja a protein kináz A-n (PKA), illetve protein kináz B-n (PKB/Akt) keresztül valósulhat meg (6).

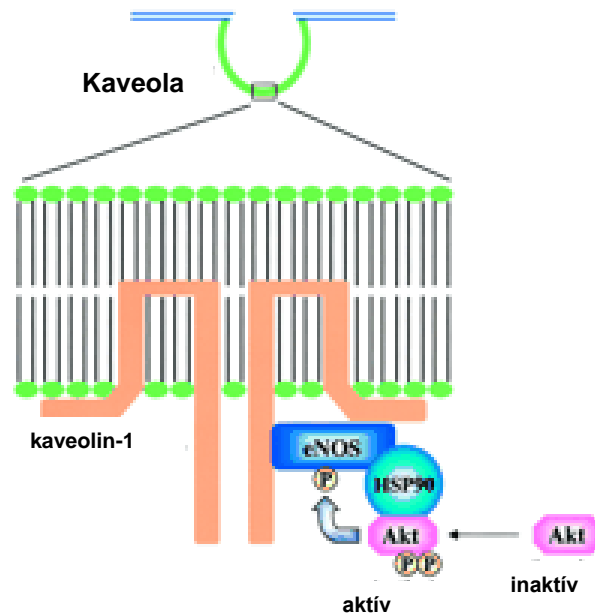
Az eNOS fehérjén eddig öt foszforilációs helyet azonosítottak, melyek közül kettő tűnik kiemelkedően fontosnak: a Ser 1179-es hely foszforilációja az eNOS aktivitás fokozódásához, a Ser 636-os helyé az enzim aktivitás gátlásához vezet (7).

Fulton és mtsai mutatták ki először, hogy az eNOS kapcsolatba lép a HSP90-nel, mely így a Ca^{2+} -kalmódulin kötéson kívül szintén fontos aktiváló hatásnak bizonyult (8). Sun és mtsai-nak megfigyelései szerint a HSP90 nemcsak az enzim működésének aktiválására, hanem közvetlenül az eNOS szintézisének indukciójára is képes (8).

A két konstitutív izoforma sejten belüli eloszlása is különbözik: a nNOS a szarkoplazmás retikulumhoz kötötten fordul elő, míg az eNOS a sejtmembrán specifikus, 50-100 nm-es bemélyedéseiben, ún. kaveolákban található (9).

A kaveolákhoz kötötten elhelyezkedő kaveolin fehérjék szintén fontos szerephez jutnak az eNOS aktivitás szabályozásában. Az eNOS és a kaveolinek interakciója gátolja az enzim aktiválódását (10,11), ugyanakkor a kalmódulin eNOS molekulához történő bekötődése oldja a kaveolin-eNOS interakciót, ezzel felszabadítja a kaveolinek gátlása alól (12).

Érdekesség, hogy nemcsak az eNOS, hanem a PKB/Akt is képes a HSP90-nel kapcsolódni, amely az eNOS esetéhez hasonlóan az Akt aktivitás fokozódásához vezet. Úgy tűnik, hogy a HSP90 egyfajta közvetítő molekulaként működik az eNOS enzim és az Akt kináz között a kaveolákban (13,14) (2. ábra).



2. ábra A kaveolákban elhelyezkedő endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) foszforilációjának szabályozása.

Az eNOS a sejtmembrán kaveoláiban a kaveolin fehérjékhez kötötten helyezkedik el. A HSP90 foszforilációval aktiválja az Akt kinázt, mely ezt követően szintén foszforiláción keresztül az eNOS aktivációjához vezet.

Az indukálható NOS (iNOS vagy NOS II) termelődése lipopoliszacharid (LPS), valamint gyulladásos citokinek, elsősorban az interferon- γ (IFN γ), interleukin-1 (IL-1) és tumor nekrozis factor- α (TNF α) hatására indul meg (15).

A gyulladásos citokinek aktiválják a nukleáris faktor- κ B (NF κ B) transzkripciós faktort, mely közvetlenül -az iNOS promoteréhez kötődve- fokozza az iNOS mRNS szintézisét (16). Az iNOS indukcióját követően teljes mértékben aktív, mivel az újonnan szintetizált molekula folyamatosan kötésben tartja a Ca²⁺-kalmodulin komplexet (16).

Az iNOS működésének szabályozásában elengedhetetlen szerepet játszanak azok a mediátor molekulák is, melyek leállítják az iNOS indukcióját.

A glukokortikoidokkal kapcsolatban ismert, hogy gátolják az iNOS működését. A dexametazon csökkenti az iNOS mRNS expresszióját az I κ B α aktiválásán keresztül,

mely gátolja az iNOS-t gyulladáscsökkentő citokinek hatására indukáló NF κ B transzkripciós faktort (17).

Ezen felül különböző növekedési faktorokról, mint a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), hepatocita növekedési faktor (HGF) és epidermális növekedési faktor (EGF) is kimutatták, hogy csökkenti az iNOS mRNS szintézisének indukcióját (18).

A dexametazon és TGF- β az indukció gátlásán kívül képesek csökkenteni az iNOS mRNS stabilitását is hozzájárulva ezzel a csökkent iNOS működéshez (19,20).

Az elmúlt évtized során több kutatócsoport is arra az eredményre jutott, hogy létezik a mitokondriumokból származó NO termelés is.

Ghfourifar és mtsai figyelték meg, hogy a belső mitokondriális membránhoz kötötten helyezkedik el egy NOS izoforma, melyet mitokondriális NOS-nak (mNOS) neveztek el (21). Vizsgálataik szerint a mNOS konstitutívan aktív, köti a Ca²⁺-ot és a mitokondriális légzési lánc, valamint a mitokondriális transzmembrán potenciál szabályozásában játszik szerepet. Felfedezése óta számos munka próbálta különböző szervezetekben és szervekben azonosítani a mNOS-t.

Bizonyos kutatócsoportok szerint a mNOS erősen kötésben tartja a kalmodulint és az eNOS-hoz hasonló immunoreaktivitással, valamint molekuláris súllyal (125-130 kDa) rendelkezik. Következtetésük szerint a mNOS az eNOS mitokondriumhoz lokalizált formája (22).

Ezzel szemben számos más vizsgálat szerint a mNOS a neuronális izoforma mitokondriumhoz kötött formája, mely a nNOS α izoformájának felel meg (23).

A megtermelt NO a keringésbe jutva a plazmában nitritté (NO²⁻) oxidálódik, majd a vörösvértestekbe diffundál, ahol oxihemoglobinnal reagálva nitráttá (NO³⁻) alakul át. A nitrát ismét a plazmába kerül és a vesén keresztül ürül ki a szervezetből.

E végtermékek mérése a szérumban és vizeletben lehetővé teszi a szervezet összes NO szintézisének meghatározását.

A nNOS-t először idegsejtekben mutatták ki, innen ered az elnevezése, de ma már ismert, hogy jelen van a vázizomzatban, herében és a bélrendszerben is. A vesén

belül a macula denza sejtjeiben helyezkedik el nagyobb mennyiségben, de megtalálható a medulláris gyűjtőcsatornában és a vasa recta sejtjeiben is (24).

Az eNOS az endotél sejtekben termelődik a legnagyobb mennyiségben, de kimutatható a motoneuronokban, illetve a vesén belül a glomeruláris epitél és proximális tubulus sejtekben, valamint a gyűjtőcsatornák epitél sejtjeiben is (20).

Az iNOS elsősorban az immunsejtekhez kötötten fordul elő, de jelen van fibroblasztokban, hepatocitákban, simaizom és epitél sejtekben is. A vesén belül a mezangiális és proximális tubulus sejtekben és a felszálló vastag szegmens sejtjeiben expresszálódik (20).

Az egyes izoformák elhelyezkedését és tulajdonságait az 1. táblázatban foglaltam össze.

	neuronális NOS (nNOS, NOS I)	endoteliális NOS (eNOS, NOS III)	indukálható NOS (iNOS, NOS II)
Lokalizáció	idegrendszer, vázizomzat, vese, here, bőr, tüdő, epitél sejt	endotél, motoneuron, vese	makrofág, neutrofil granulocita, fibroblaszt, hepatocita, endotél, simaizom, epitél sejt
Vesén belüli lokalizáció	macula denza, medulláris gyűjtőcsatorna, glomerulusok, vasa recta, idegsejtek	glomerulusok, proximális tubulusok, preglomeruláris erek, felszálló vastag szegmens, gyűjtőcsatornák	mesangiális sejtek, proximális tubulus, medulláris felszálló vastag szegmens
Működés	konstitutív	konstitutív	indukálható
Termelt NO koncentrációja	nanomól	nanomól	mikromól
Elsődleges funkció	neurotranszmisszió	értónus szabályozás	nem specifikus immunválasz
Méret	161 kDa	133 kDa	131 kDa
Sejten belüli elhelyezkedés	citoszol	sejtmembrán kaveolák	citoszol
Szerkezet	homodimer	homodimer	homodimer

1. táblázat A NO szintáz enzimek izoformái, lokalizációja és tulajdonságai.

5.2. A NO hatásmechanizmusa és biológiai szerepe

A NO a szervezetben általánosan termelődik és elsősorban a vasoaktív folyamatokban, a neurotransmisszióban, valamint gyulladásos mechanizmusok szabályozásában vesz részt.

A NO hatása -erős reakciókészsége és rendkívül rövid féléletideje (10-30 ms) miatt- lokális. A sejten belül keletkező NO diffúzióval jut a környező sejtekbe, önálló receptorral nem rendelkezik (20).

A NO hatását alapvetően az befolyásolja, hogy milyen koncentrációban termelődik és milyen más mediátorok vannak jelen a környezetében. A NO szintázok közül a két konstitutív izoforma kis koncentrációban ($<1 \mu\text{M}$) termeli a NO-t.

A kis koncentrációban termelődő NO célmolekulái közül legfontosabb a hem csoportot tartalmazó szolubilis guanilát-cikláz (sGC) enzim. A sGC aktivációján keresztül a NO a simaizomsejtek relaxációját okozza (érfal, bélal, bronchusok simaizomzatának relaxációja), gátolja a trombociták aggregációját, illetve az idegrendszerben befolyásolja a neurotransmisszió folyamatát. A központi idegrendszerben elsősorban a memória képzésben van fontos szerepe (25), ugyanakkor az autonóm idegrendszer területén gátló neurotransmitterként működik. Ezzel hozzájárul a bélrendszer, valamint a corpus cavernosum simaizomzatának relaxációjához (26,27).

A fent felsorolt hatásokon kívül a kis koncentrációban termelődő NO a sGC-től függetlenül S-nitrozilációval képes fokozni az NF-kB, illetve E2F1 transzkripciós faktorok működését is (28).

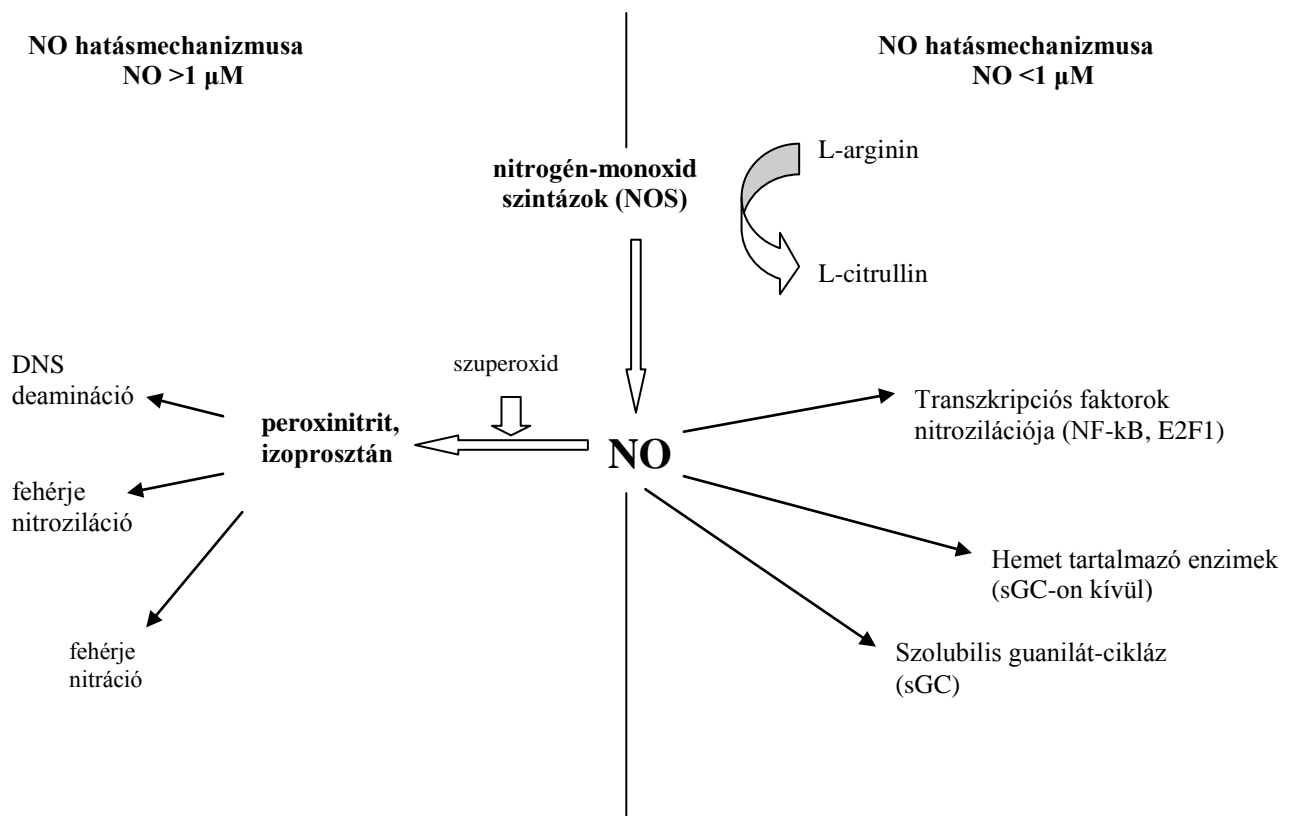
Az iNOS nagyobb koncentrációban szintetizálja a NO-t ($>1 \mu\text{M}$). Az iNOS által termelt NO képes gátolni bizonyos vírusok, illetve paraziták replikációját (29), valamint oxigén szabadgyökökkel reagálva citotoxikus nitrogén szabadgyökökké alakulhat. Így a nagy koncentrációban termelt NO elsősorban a nem specifikus immunválasz részeként a mikróbák elleni küzdelemben játszik fontos szerepet.

A NO és a szuperoxid anion reakciójából keletkező peroxinitrit olyan szabadgyök, mely ha nagyobb mennyiségben termelődik, oxidálhatja a thiolokat és thiol észtereket, nitrálja a tirozin csoportokat, nitrálja és oxidálja a guanozint, a szénhidrátok

degradációjához, illetve lipid peroxidációhoz, valamint a DNS feldarabolódásához vezethet (30).

Ezen felül a nagy mennyiségben jelenlevő NO vizes környezetben dinitrogén-trioxiddá alakulhat, mely különböző fehérjék nitrozilációját okozhatja.

Összefoglalóan, ezeken a mechanizmusokon keresztül a nagy koncentrációban termelődő NO képes több szinten károsítani a fehérjék, valamint a DNS és ezen keresztül a sejtek élettani funkcióját.



3. ábra A nitrogén-monoxid (NO) hatásmechanizmusának összefoglalása.

A kis koncentrációban (<1 μM) termelődő NO a sGC és egyéb hem csoportot tartalmazó enzimek, valamint a NF-kB, illetve E2F1 transzkripciós faktorok működését befolyásolják. A nagy koncentrációban (>1 μM) termelődő NO szabadgyökök (peroxinitrit és izoprosztán) keletkezésén keresztül fehérje nitroziláló és nitráló hatást fejt ki, valamint deaminálja a DNS molekulát.

A NO központi szerepet játszik az apoptózis, azaz a programozott sejthalál szabályozásában is.

Pro- vagy anti-apoptotikus hatása nem a szintáz izoformájától, hanem ebben az esetben is elsősorban a termelt NO koncentrációjától, valamint a környezeti hatásoktól függ.

Song és mtsai figyelték meg, hogy a TNF- α indukálta, ún. halál receptor közvetítette apoptózis az iNOS indukcióján keresztül zajlik. (31) A nagy koncentrációban termelődő NO képes fokozni az egyik legfontosabb halál receptor, a CD95 vagy más néven Fas mRNS szintézisét is (32).

A kis koncentrációjú NO gátolja, a nagy koncentrációjú NO elsősorban a peroxinitrit képződésén keresztül ugyanakkor fokozza a mitokondriumok citokróm c leadását, hozzájárulva ezzel a citokróm c kiváltotta kaspáz aktivációhoz (33), mely az apoptózis egyik központi szabályozó lépése. Érdekesség ugyanakkor, hogy a mNOS által mitokondriumokban termelt alacsony koncentrációjú NO-nak közvetlen szerepet tulajdonítanak az apoptózis során végbemenő mitokondriális citokróm c leadásban.

In vitro izolált vese tubulus sejtekből származó mitokondriumokban a mNOS közvetlen gátlása nNOS gátlószerral csökkentette a citokróm c leadását (61).

A NO képes növelni a pro-apoptotikus Bax mRNS szintézisét (34), mely szintén az apoptózis mitokondriális szabályozó folyamatainak egyik kulcs mediátora.

Az iNOS aktivitás növekedése csökkenti az anti-apoptotikus XIAP és cIAP1 fehérje szintjét makrofágokban (35), illetve fokozza a pro-apoptotikus p53 expresszióját.

Ezzel szemben a NO képes a kaspázok, valamint az aktivátor protein-1 (AP-1) transzkripció faktor nitrozilációjára is, ezzel gátolja azok működését, ezen keresztül az apoptózis gátlásához vezet (36).

A NO megemeli a hősokk protein 70 (HSP70) szintjét is, mely közvetlenül köti az Apaf-1 transzkripció faktort ezzel szintén gátolja az apoptózis kialakulását (37).

Pro-apoptotikus hatás	Anti-apoptotikus hatás
CD95 (Fas) mRNS szintézis fokozása	AP-1 működésének gátlása
Bax mRNS szintézis fokozása	Kaspázok gátlása
Mitochondriális citokrom c leadás fokozása	HSP70 szintézisének fokozása
p53 fehérje szintézis fokozása	
XIAP és cIAP1 szintézis gátlása	

2. táblázat A nitrogén-monoxid (NO) és az apoptózis szabályozásának összefoglalása.

5.3. A NO és a vese I/R patomechanizmusának kapcsolata

5.3.1. A NO általános szerepe a vesében

A NO a vesében fiziológias körülmények között részt vesz a tubuláris Na⁺-transzport, a tubulo-glomeruláris feedback szabályozásában és szerephez jut számos patofiziológiai folyamatban is (38). A NO szintézis gátlása a vesében a pre- és posztglomeruláris ellenállás, valamint a glomeruláris kapilláris nyomás emelkedéséhez vezet, miközben a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) nem változik számottevően (39). Krónikus vesebetegségekben csökken a vesében a nNOS expressziója (40). Magasabb kiindulási renális nNOS expresszió lassítja a krónikus veseelégtelenség progresszióját. (41).

5.3.2. A vese I/R károsodásának általános patomechanizmusa

Az akut veseelégtelenség 70-80%-ának kialakulásáért a vese iszkémiás károsodása felelős, melynek gyógyítása jelenleg is tüneti kezelésre szorítkozik.

Szervtranszplantáció esetében a graftot ért iszkémiás károsodás mai ismereteink szerint a korai és késői graftműködés egyik legfontosabb ún. nem-alloantigén függő rizikófaktora.

A donorból eltávolított szerv az azonnali hűtés és gondos perfundálás ellenére is az iszkémiás károsodás jeleit mutatja. A recipiens szervezetében az iszkémiát követő reperfüzió akut gyulladást indukál, mely a graftműködés késői megindulását okozhatja és a krónikus allograft nefropátia kialakulásában játszik szerepet (42).

Az iszkémia okozta akut vesekárosodás egymással összefüggő kaszkád mechanizmusok sorából áll, melyek akut és krónikus következményekkel járhatnak.

Az utóbbi években számos munka kimutatta, hogy a vesében I/R alatt végbemenő folyamatok leginkább egy komplex gyulladást immunválasznak felelnek meg. Az, hogy az iszkémiás vesekárosodás alatt jelentkező sejtes válasz bizonyos esetekben miért marad fenn tartósan és mennyire befolyásolja későbbiekben a vese funkcióját, egyelőre nem ismert pontosan.

A vesén belül a medulla és a nagy transzport aktivitású proximális tubulusok a legérzékenyebbek iszkémiás károsodással szemben (43). Az iszkémia korai szakaszára elsősorban a tubulus sejtek hipoxiás károsodása (44), az endotél és szöveti gyulladást sejtek aktiválódása és a kis erek elzáródása jellemző. Az endotél sejtek megduzzadnak, az érlumen beszűkül, a kapillárisokban sztázis alakulhat ki (no-reflow jelenség) (45,46).

Az iszkémia megszűnése után a reperfüzió fázisában zajló folyamatok tovább rontják a vese működését. Reperfüzió alatt megindul a leukociták kitapadása, szövetközi térbe vándorlása, majd peritubuláris felszaporodása (47). A kitapadt leukociták reaktív oxigénradikálokat, számos gyulladást citokint és kemokint termelnek, melyek közül mai ismereteink szerint a legfontosabbak az IL-1, TNF- α , TGF- β és fő kemoattraktáns protein-1 (MCP-1).

Még az iszkémiás fázisban fokozódik az endoteliális adhéziós molekulák expressziója. Az endotélsejtek felszínén megnő a leukociták haladását lelassító P- és E-szelektinek kifejeződése (48,49). Az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) szintén magasabb szinten kezd expresszálni az endoteliális sejteken (50). Ezek az adhéziós fehérjék a leukociták felszínén található L-szelektinnel valamint a β -integrinnel történő kapcsolódásuk révén részt vesznek a leukocita-endotélium interakcióban.

Központi szerepüket azok a megfigyelések is alátámasztják, miszerint különböző I/R állatmodellekben mind a szelektinek, mind az ICAM-1 mediálta leukocita-endotél sejt interakció gátlása csökkenti a vese posztisztkémiás károsodását (51,52,53).

A gyulladós válasz megindításában a vese tubulus sejtek is részt vesznek azzal, hogy maguk is képesek különböző gyulladós citokineket (IL-1 β , TNF- α) és kemokineket (MCP-1, IL-8) termelni (54).

A felszabaduló proinflammatorikus citokinek és szabadgyökök aktiválják a NF- κ B és AP-1 gyulladós transzkripciós faktorokat, melyek tovább fokozzák a leukociták szövetközi térbe vándorlásáért felelős adhéziós molekulák expresszióját az endotél sejtek felszínén, így megemelkedik az ICAM-1, vaszkuláris adhéziós molekula-1 (VCAM-1) és E-szelektin expressziója.

Krónikus allograft nefropátia állatkísérletes modelljében is kimutatták, hogy a leukociták endotéliumon keresztül történő vándorlásában fontos szerepet játszanak a leukociták felszínén jelenlevő, az ICAM-1 molekulával kötést alkotó β 2-integrinek (55).

Az I/R következtében aktiválódó gyulladós folyamatok a vese sejtjeinek elhalásához vezethetnek.

A hipoxiára legérzékenyebb proximális tubulus sejtek Lieberthal és mtsainak vizsgálatai szerint a hipoxia mértékétől függően vagy apoptózis vagy nekrozis következtében pusztulnak el: enyhe ATP hiány a sejtek apoptotikus elhalásához, súlyos ATP hiány a sejtek nekrozisához vezet (56).

Schumer és mtsai igazolták elsőként in vivo modellben is, hogy míg korábban a nekrozist tekintették az I/R károsodás során bekövetkező sejtpusztulás fő formájának, már 12 órával a reperfüzió megindulását követően felismerhetők a vesében az apoptózis morfológiai jelei is (57).

Az apoptózist elindíthatják és vezérelhetik külső sejtszignálok: extracelluláris és intracelluláris molekulák. Az utóbbiak lehetnek: hormonok, növekedési faktorok és gyulladós citokinek, illetve korábban részletezett mechanizmusokon keresztül maga a NO is.

Az apoptózist jellegzetes változások kísérik, melyek nyomon követhetőek a sejteken: a kromatin kondenzálódik és a sejtmaghártyához tapad, a citoplazma sejtmembrán hasadás nélkül zsugorodik, a sejt membránnal határolt csomagokba kerül, majd fagocitálódik.

5.3.3. A NO hatása és a NO szintáz enzimek expressziója vese I/R-ban

A NOS enzimek nem szelektív gátlása nem károsodott szövetben hasonló mikrovaszkuláris elváltozásokhoz vezet, mint a posztisztkémiás szervre jellemző mikrovaszkuláris diszfunkció és gyulladós folyamatok megjelenése (leukocita és endotél interakció, trombocita aggregáció, hízósejt degranuláció és fokozott albumin filtráció).

Ezzel szemben vese I/R károsodás során alkalmazott nem szelektív NOS gátlószer, az L-nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) csökkenti az apoptotikus sejtek számát a posztisztkémiás vese szövetben utalva arra, hogy az össz-NOS működés és NO termelés rontja a vesekárosodás mértékét.

Vese I/R során a gyulladós sejtekben, valamint a mezangiális és a belső medulláris gyűjtőcsatorna sejtjeiben aktiválódó NF- κ B az iNOS enzim mRNS szintézisének indukciójához vezet (45).

In vivo vizsgálatok szerint az iNOS aktivitás megemelkedik az I/R indukálta vesekárosodás első 24 órájában a vese kortexben és a medullában a felszabadult NO végtermékek (NOx) mérésének alapján. A reperfüziót követő 7. napon a kortexben visszatér a normális szintre, de a medullában továbbra is emelkedett marad az expressziója.

Az iNOS által nagy koncentrációban termelt NO különböző szabadgyökökkel reagál, így elsősorban citotoxikus peroxinitrit és izoprosztán szabadul fel, melyek közvetlenül a tubulus sejtek funkcionális károsodásához, nekrozisához, illetve apoptózisához vezethetnek (58,59). Tovább rontja a helyzetet a peroxinitrit és izoprosztán kifejezett vazokonstriktor hatása is. A nagy koncentrációban jelen lévő NO egyéb, korábban említett mechanizmusokon keresztül az apoptózis mértékét is növeli.

Epiteliális sejteken végzett in vitro vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy az iNOS szintézisének szelektív gátlása megakadályozza a sejtek hipoxiás károsodásának kialakulását (60).

In vivo kísérletek során alkalmazott szelektív iNOS gátlószer szintén csökkenti az I/R vesekárosodást követően a plazma kreatinin, nitrit és nitrát szinteket, illetve a szöveti károsodás és az apoptózis mértékét (30,61). iNOS knock-out egerekből izolált proximális tubulus sejtek ellenállóak in vitro hipoxiával szemben (62), valamint iNOS

knock-out egerekben létrehozott posztisztkémiás vesekárosodás csökkent mértékben zajlik vad típusú állatokhoz képest (63).

Összefoglalóan, eddigi ismereteink szerint az iNOS aktivitás fokozódása súlyosbítja az iszkémia okozta szöveti károsodás mértékét a vesében (64).

Az iNOS megemelkedett NO szintézise elnyomja az elsősorban endotél sejtekben lokalizált eNOS NO termelését. Ezzel párhuzamosan az iszkémia következtében kialakuló szöveti acidózis szintén gátolja az eNOS aktivációját (65), valamint a szöveti károsodás kialakulása során nagy mennyiségben felszabaduló TNF- α egyaránt csökkenti az eNOS mRNS stabilitását (66) hozzájárulva ezzel a csökkent eNOS aktivitáshoz.

Az eNOS lecsökkent NO termelése az iszkémiás károsodást szenvedett vesében megfigyelhető endoteliális diszfunkció egyik legfontosabb oka. Az endoteliális diszfunkciót elsősorban az acetilkolinra adott csökkent vazodilatációs válasz, illetve a trombociták aggregációja jellemzi.

Az endotél sejtek diszfunkcióját súlyosbítja az is, hogy az iNOS túlműködés következtében keletkező szabadgyökök maguk is közvetlen erős vazokonstriktorok.

A korábban kialakult nézetekkel szemben Vinas és mtsai ugyanakkor azt figyelték meg, hogy iszkémiás vesekárosodásban 24 órával a reperfüzió után nemcsak az iNOS, hanem az eNOS mRNS és fehérje expressziója is emelkedett volt (61).

Ezzel szemben Mount és mtsai szerint a foszforilált eNOS fehérje szintje nem változik a vesében iszkémiát követően, bár vizsgálataikat viszonylag rövid, csak 30 perces reperfüziós idő után végezték (67).

Ugyan az eNOS által termelt alacsony koncentrációjú NO-hoz elsősorban vazorelaxációs és anti-apoptotikus tulajdonságokat társítanak, melyek egyaránt az iszkémiás veseszövet védelmét szolgálják, Vinas és mtsainak megfigyelései szerint az eNOS enzim szelektív gátlása nem fokozza, hanem éppen ellenkezőleg, csökkenti a szöveti károsodást és az apoptózis mértékét vese I/R-t követően (67). A gátlószerrel kezelt csoportban csökkent iNOS expressziót lehetett kimutatni, így elképzelhető, hogy a protekciót nem közvetlenül az eNOS aktivitás gátlása, hanem az iNOS csökkent mRNS szintézise közvetítette.

Szintén Vinas és mtsai mutatták ki a már fent idézett munkájuk során, hogy a harmadik izoforma, a nNOS mRNS expressziója nem változik áloperált veséhez képest

24 órával a reperfüzió után. Ezzel szemben a mNOS mRNS expressziójában emelkedést lehetett detektálni. Ugyanebben a munkában a nNOS szelektív gátlása megváltoztatta a szöveti károsodás és apoptózis mértékét vese I/R károsodást követően (61).

5.3.4. NO donor molekulák hatása I/R vesekárosodásban

A NO szintézisének és ezzel szöveti mennyiségének egyik legfontosabb meghatározója az L-arginin mennyisége, mely a NO iszkémiás folyamatokban betöltött szerepét vizsgáló munkákban a leggyakrabban használt NO donor molekula.

Az L-arginin alkalmazás hatása a vese I/R károsodás kialakulásában ellentmondásos. Egyes vizsgálatok protektív, mások a károsodást fokozó, míg egyesek semmilyen hatásról nem tudtak beszámolni (68,69,70,71).

Az L-arginin emelkedett NO szintézishez vezet, valamint fokozza egyes hormonok, mint az inzulin, inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1), glukagon, növekedési hormon és szteroidok felszabadulását, melyek közül az inzulin és IGF-1 protektív hatása jól ismert I/R károsodásban (72).

A D-arginin ugyanakkor nem befolyásolja a posztisztkémiás vesekárosodás kimenetelét, habár a fent leírt hormonok felszabadításában ugyanolyan hatásosnak bizonyult, mint az L-izofорма (73).

A szintén NO donor molsidomine szisztémás adása I/R vesekárosodást követően javítja a károsodást szenvedett állatok túlélését, csökkenti az I/R károsodásra jellemző citokin (TNF- α , IL-1) és szuperoxid anion felszabadulást, illetve a neutrofilek szövet közötti térbe vándorlását (74). Molsidomine intrarenális adása hasonló hatású: csökken a szuperoxid anion és a gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-1 β és IFN- γ) szintje, ugyanakkor a gyulladásellenes citokinek (IL-10) szintje megemelkedik. A gyulladásos sejtek infiltrációja és a sejtadhéziós molekulák (ICAM-1, PECAM-1, VCAM és P-szelektin) expressziója is kisebb a kezelt csoportban (75).

A szintén NO donor nitropussid-nátriummal kezelt állatokban az iszkémiás vesekárosodás mértéke és a neutrofil infiltráció csökken, illetve alacsonyabb az apoptotikus p53 gén expressziója és az apoptotikus sejtek aránya a veseszövetben (76).

5.3.5. Iszkémiás prekondicionálás és a NO rendszer kapcsolata

Az iszkémiás prekondicionálás a később I/R károsodásnak kitett szerv előzetes, szubletális időtartamú iszkémiával történő indukálása, mely ismereteink szerint megnöveli a szerv I/R károsodással szembeni toleranciáját.

A vese iszkémiás prekondicionálása növeli a NO metabolitok szintjét és az eNOS expresszióját a veseszövetben (77).

eNOS knock-out egerekben az iszkémiás prekondicionálás nem befolyásolja az I/R vesekárosodás lefolyását, ugyanakkor vad típusú kontrollokban javítja a vese funkcióját és a szöveti károsodás mértékét.

Nem szelektív NOS gátlószer adása gátolja, ugyanakkor iNOS-ra specifikus gátlószer nem befolyásolja az iszkémiás prekondicionálás hatását (78), mely szintén arra utal, hogy az iszkémiás prekondicionálás többek között az eNOS aktivitás fokozódásán keresztül fejt ki védő hatását.

5.4. A NO rendszer és az iszkémia indukálta retinopátiák kapcsolata

5.4.1. A koraszülöttek retinopátiájának patogenezeise

A koraszülöttek retinopátiája (retinopathy of prematurity - ROP) a retina kis ereinek rendellenes növekedésével és kóros proliferációjával járó igen súlyos kórkép, mely a gyermekkori vakság vezető oka. A ROP az 1250 g alatti születési súlyú koraszülöttek mintegy 50%-át érinti.

A fejlődésben levő retina a magzati élet 36. hetéig igen érzékeny a relatív hiperoxiára. Az éretlen, kissúlyú koraszülöttek esetében a megszületést követően a magzati élethez képest a retinában hirtelen megemelkedik az oxigén szöveti nyomása. Az így kialakult relatív szöveti hiperoxia a már meglévő retina erek elzáródását (vazo-obliteráció) okozza (ROP első fázisa) (79).

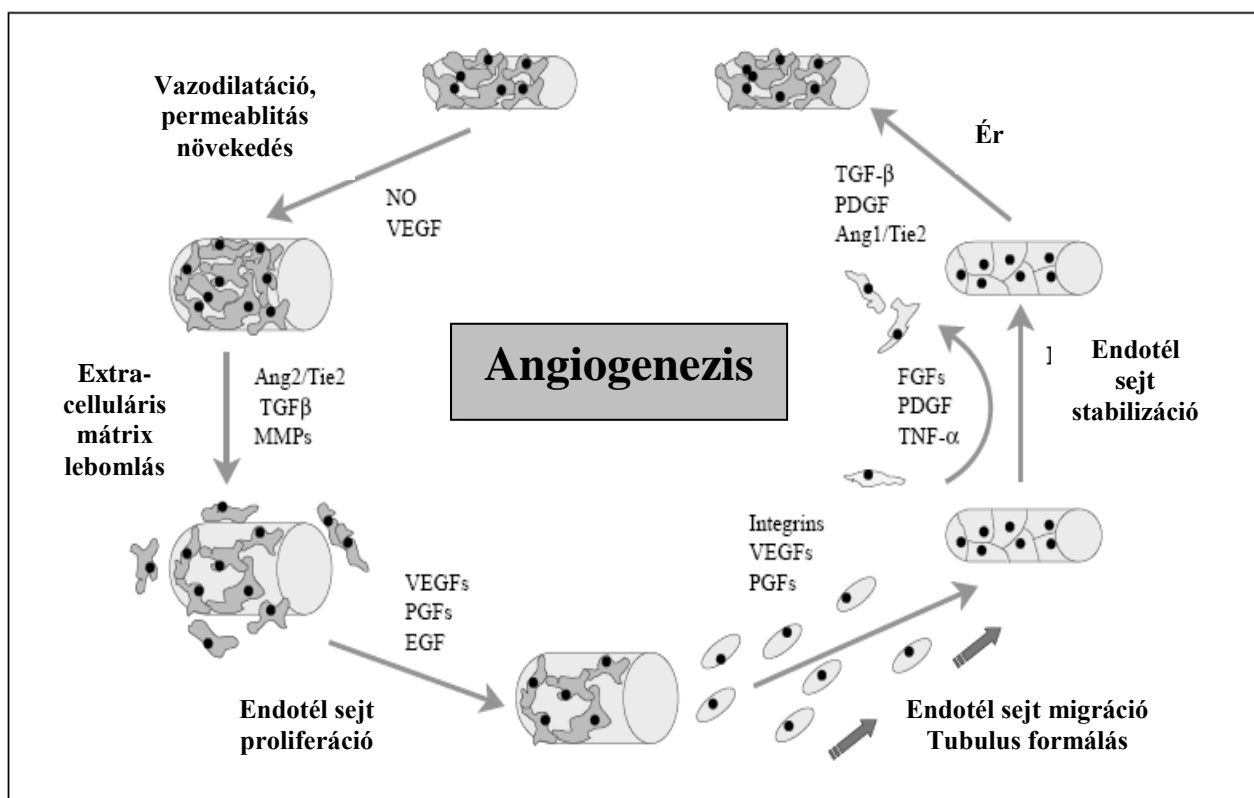
A vazo-obliteráció következtében kialakult retinális iszkémia kóros vaszkulo- és angiogenezist indukál (ROP második fázisa, proliferatív retinopátia). E szabálytalan, gyors növekedés során a kis erek bevérézhetnek, ami hegesedéshez vezet (80).

A legsúlyosabb esetben a folyamat a retinát leválaszthatja a szemfenékről és vakság alakulhat ki (80).

5.4.2. A NO szerepe az iszkémia indukálta angio- és vaszkulogenezisben

Az angiogenezis komplex biológiai folyamat, melyben az irányító szerepet az endoteliális sejtek játsszák.

Az angiogenezis a meglévő, kiindulási pontként szolgáló érfal vazodilatációjával és permeabilitásának fokozódásával indul (80). Ezt követi az endoteliális sejtek proliferációja, migrációja, valamint az extracelluláris mátrix emésztésére alkalmas proteázok termelése és szekréciója (81) (4. ábra).



4. ábra. Az angiogenesis folyamatának összefoglalása. Az érfejlődés kezdeti lépése a vazodilatáció, valamint a fokozott kapilláris permeabilitás, mely lehetővé teszi a plazma-proteinek (fibrinogén, plazminogén) transzportját a lumenből a perivaszkuláris térbe. Ezt követően az angiogenetikus faktorok hatására megindul endothél sejtek proliferációja és migrációja. Az új endothél sejtek végül tubulusokat alkotnak és stabilizálódnak a körülöttük elhelyezkedő extracelluláris mátrixhoz (82).

A vaszkuláris-endotheliális növekedési faktor (VEGF) szerkezetileg a trombocita-eredetű növekedési faktorról (PDGF) egy családba tartozó homodimer glikoprotein, mely az endothél sejtek egyik legfontosabb mitogén faktora.

A VEGF különböző szignál transzdukciós útvonalakon keresztül az endothél sejtek differenciálódását (83), proliferációját (84), apoptózisát (85) és migrációját (86) szabályozza.

A koraszülöttek retinopátiájának első, hiperoxia által kiváltott fázisában a VEGF szintézise lecsökken, mely a már kifejlődött kapillárisok elzáródását eredményezi (87).

A ROP második fázisában a retinában kialakult hipoxia a VEGF szintézisét indukálja (88,89).

Kiegészítő vizsgálatokban szintén megfigyelték, hogy a VEGF szintje emelkedik a retina neovaszkularizációjával járó kórképek kialakulása során a betegek szemfolyadékában (90). A VEGF farmakológiai gátlása csökkent neovaszkularizációt okoz a retinában (91).

Az eNOS által termelt NO a VEGF angiogenezist indukáló hatásának egyik legfontosabb effektor molekulája (92,93,94).

A VEGF, miután bekötődött az endotél sejteken található receptorához, fokozza a PKB/Akt kináz aktiváló foszforilációját. Ezt követően az aktivált PKB/Akt foszforilálja az eNOS-t, mely az enzim aktivitásának növekedéséhez vezet, így megemelkedik az endotél sejtek NO termelése.

VEGF hatására fokozódik az eNOS és a HSP90 interakciója is a kaveolákban, mely szintén az eNOS enzim aktivitásának fokozódását okozza (95). A HSP90 farmakológiai gátlása csökkenti a VEGF-re adott eNOS foszforilációs választ, amit az endotél sejtek csökkent migrációja és összességében csökkent angiogenezis kísér (93).

Az endostatin egy olyan endogén anti-angiogén faktor, mely az endotél sejtek migrációját gátolja és apoptózisukat fokozza.

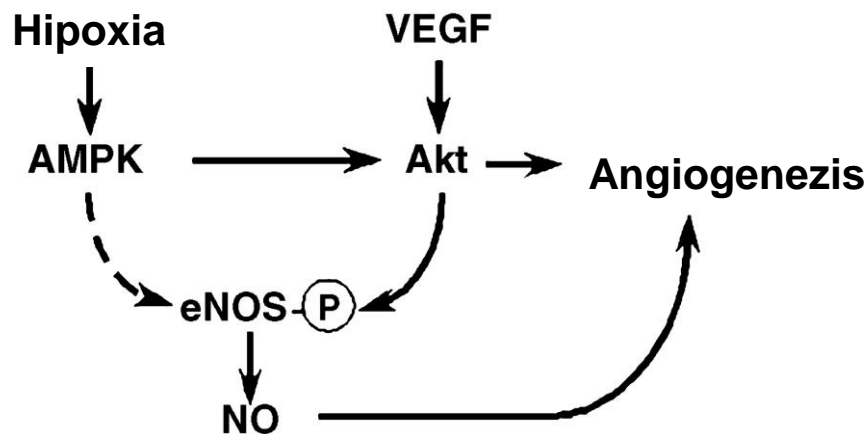
Rekombináns endostatin adása csökkentette az endotél sejtek in vitro migrációját és ezzel párhuzamosan a VEGF által előidézett eNOS aktiváló foszforilációját (96). Ugyanakkor NO donor molekula adása ellensúlyozta az endostatin endotél sejtek migrációját gátló hatását, mely arra utal, hogy az endostatin az eNOS működés gátlásán keresztül fejt ki anti-angiogenetikus hatását.

Az ún. AMP aktivált protein kináz (AMPK) AMP kötés hatására aktiválódó protein kináz. Olyan patológiás folyamatokban jut szerephez, melyekben -többek között- hipoxia/anoxia hatására a sejtkben csökken az ATP és megnő az AMP szintje. Az aktivált AMPK ezt követően elsősorban olyan szignalizációs és metabolikus folyamatokat aktivál, melyek csökkentik a sejtek ATP felhasználásának igényét, illetve gátolják az apoptózist, így növekszik a sejtek túlélésre való esélye.

Az AMPK hipoxiás körülmények között a VEGF-hez hasonlóan foszforiláción keresztül aktiválja a PKB/Akt kinázt, mely -ahogy a VEGF esetében is- az eNOS foszforilációján keresztül az angiogenezis indukciójához vezet (97) (5. ábra).

Egyes irodalmi adatok utalnak arra is, hogy az AMPK hosszan tartó hipoxiát követően közvetlenül képes foszforilálni az eNOS-t is.

Összefoglalva, az AMPK a VEGF mellett a hipoxia által kiváltott angiogenezis egyik legfontosabb szabályozó molekulája, mely angiogenetikus hatását az eNOS aktivitás fokozásán keresztül éri el. Fontos azonban megjegyezni, hogy normoxiás körülmények között az AMPK nem befolyásolja az endotél sejtek angiogenetikus tulajdonságait.



5. ábra A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és az AMP aktivált kináz (AMPK) szignalizációja hipoxia indukált angiogenezis során. A VEGF és a hipoxia hatására aktiválódó AMPK a PKB/Akt aktiváló foszforilációját növeli, mely foszforilálja az eNOS-t, ezzel fokozza annak NO termelését. A megemelkedett NO szintézis az angiogenezis fokozódásához vezet. Elhúzódó hipoxia esetén az AMPK közvetlenül is képes az eNOS foszforilációjára (93).

A megnövekedett eNOS aktiváció következtében az endotél sejtekben nagyobb mennyiségben felszabaduló NO a cGC enzimen keresztül az angiogenezis egyik meghatározó lépéséhez, az ér vazodilatációjához vezet.

Ezt kiegészítve S-nitrozilációval módosítja az E2F1 és NF- κ B transzkripciós faktorok (98), valamint a kaszpázok működését, gátolva ezzel az endotél sejtek apoptózisát (99), ami szintén az érfejlődés fokozódásához vezet.

Iszkémiás izomszövetben (100), valamint agyi erek falában átmeneti iszkémiát követően fokozódik az eNOS expressziója (101,102,103).

Chen és mtsai megfigyelték, hogy az eNOS gén bejuttatása az iszkémiás károsodást szenvedett szívizom szövetbe fokozza az újonnan képződött kapillárisok sűrűségét (104). Bár eNOS knock-out egerekben az embrionális fejlődés alatt nem lehet kóros vaszkulo- és angiogenezist megfigyelni, az iszkémia következtében létrejött angiogenezis csökkent mértékben zajlik a vad típusú állatokhoz képest: eNOS knock-out egerekben végtag iszkémia után kevesebb az újonnan képződött erek száma, illetve az a. carotis leköttése után nem zajlik angiogenezis (105).

Nem szelektív NOS gátlószer alkalmazása csökkenti az arteriogenesis és angiogenesis mértékét iszkémiás szívizom szövetben (106).

Olyan hemangioendotelioma sejtekben, melyekben RNS interferencia technikával gátolt az eNOS fehérje szintézise, kisebb a sejtek proliferációjának mértéke és jelentősen változik az angiogenezist szabályozó fehérjék termelése (107).

5.4.2.1. Az eNOS szerepe a koraszülöttek retinopátiájának kialakulásában

eNOS knock-out egerekben a ROP-ra jellemző első (vazo-obliteráció) és második fázis (neovaszularizáció) csökkent mértékben zajlik vad típusú állatokhoz képest.

A NOS enzimeket gátló N-nitro-l-argininnel (L-NNA) kezelt állatokban a knock-out egerekhez hasonló mértékű csökkenést lehetett kimutatni a vazo-obliteráció és neovaszularizáció mértékét illetően (108).

Ezzel szemben Beauchamp és mtsai-nak vizsgálatai azt mutatták, hogy az eNOS által termelt NO a ROP első, hiperoxia által kiváltott vazo-obliterációs fázisában betöltött szerepe nagymértékben függ a környezet redox potenciáljától: abban az esetben, mikor a hiperoxiának kitett retina redox potenciálját szuperoxid dizmutáz alkalmazásával a normális szintre állították vissza, L-NNA-nel végzett kezelés a

korábbi vizsgálati eredményekkel szemben súlyosbította a retinában kialakuló vazo-obliterációt (109).

5.4.3. Az eNOS genetikai polimorfizmusai

Az eNOS gén szakaszán számos polimorfizmust azonosítottak, melyek közül a promoter régióban elhelyezkedő T⁻⁷⁸⁶C és a 7. exonon található Glu298Asp cserével járó pontmutáció, valamint a 4. intronon található 27 bázispáros szakasz kiesésével járó 27-bp repeat polimorfizmus (a/b) azok, melyeket a leginkább vizsgáltak.

A három polimorfizmus közül a T⁻⁷⁸⁶C és a 27-bp repeat polimorfizmus bizonyítottan funkcionális polimorfizmusok.

A T⁻⁷⁸⁶C csere a gén csökkent promoter aktivitásával jár, így az eNOS alacsonyabb mRNS szintéziséhez vezet (110). Miyamoto és mtsai azonosították először, hogy a ⁻⁷⁸⁶C allél képes megkötni az A1 nevű replikációs fehérjét, mely a gén átíródásának gátlását okozza (111). Ezt alátámasztja Ohtoshi és mtsai-nak megfigyelése is, miszerint a ⁻⁷⁸⁶C allél hordozóiban a plazma NO metabolitok szintje szignifikánsan alacsonyabb a ⁻⁷⁸⁶C allélt nem hordozókhoz képest (112).

A 27-bp repeat polimorfizmus „a”, azaz mutáns alléljének hordozóiban szintén szignifikánsan alacsonyabb a NO metabolitok szintje a plazmában (113). Ennek oka az lehet, hogy a többletben lévő 27 bp-os szakasz képes génátíródást gátló és serkentő faktorok megkötésére, ezzel befolyásolva az eNOS mRNS expresszióját (114), de a pontos mechanizmus egyelőre nem ismert.

5.4.3.1. Az eNOS genetikai polimorfizmusok és a diabéteszes retinopátia összefüggései

Az eNOS fent említett három polimorfizmusainak mindegyikét összefüggésbe hozták több kardiovaszkuláris megbetegedés, úgy mint a koronária betegség, magas vérnyomás és agyi iszkémiás állapotok kialakulásával (115).

Számos munka vizsgálta az eNOS genetikai polimorfizmusainak szerepét diabéteszes retinopátiában (DR), mely a ROP második fázisához hasonlóan a retina iszkémia következtében létrejövő kóros érproliferációval jellemezhető elváltozás.

Taverna és mtsai összefüggést találtak az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus és a DR között: eredményeik szerint az eNOS homozigóta aa mutáns genotípus védelmet nyújt a DR kialakulásával szemben (116).

Egy későbbi munkájukban azt is kimutatták, hogy diabéteszes betegekben az eNOS C⁻⁷⁸⁶C homozigóta mutáns genotípusa a DR korai megjelenésének független rizikófaktora (117).

Ezzel szemben de Syllos és mtsai (118), Awata és mtsai (119), valamint Suganthalakshmi és csoportja (120) nem találtak összefüggést sem az eNOS 27-bp repeat, sem a T⁻⁷⁸⁶C, valamint a Glu298Asp genetikai polimorfizmusok és a DR kialakulása között.

Annak ellenére, hogy az eNOS szerepe bizonyított a ROP patogenezisében, nem rendelkezünk irodalmi adattal arról, hogy van-e összefüggés az eNOS genetikai polimorfizmusok és a ROP kialakulása között. A VEGF, mely az eNOS működés egyik központi szabályozója angiogenezis során, T⁻⁵⁰⁹C (121), G⁺⁴⁰⁵C (122) polimorfizmusai és a ROP kialakulása között összefüggést írtak le.

6. Célkitűzések

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy milyen hatást fejt ki a NO szubsztrát L-arginin és a szelektív nNOS gátlószer 7-nitroindazol (7-NI) a vese iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása során.

Ezenkívül vizsgáltuk az eNOS gén két funkcionális genetikai polimorfizmusának a kissúlyú koraszülöttek retinopátiájának kockázatával való kapcsolatát.

6.1. A NOS izoformák expressziója vese I/R károsodásban

1. Kimutatható-e a 7-nitroindazol (7-NI) vesekárosodásra gyakorolt hatása I/R károsodás során?
2. Kimutatható-e az L-arginin vesekárosodásra gyakorolt hatása I/R során?
3. Hogyan változik a NOS enzimek mRNS és fehérje expressziója vese I/R során, valamint L-arginin és 7-NI kezelést követően?

6.2. Az eNOS génpolimorfizmusok és a kis születési súlyú koraszülöttek retinopátiája közötti kapcsolat vizsgálata

4. Van-e kapcsolat a kis születési súlyú koraszülöttek retinopátia kockázata és az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusai között?

7. Anyagok és módszerek

7.1. *In vivo* vese I/R állatmodell

7.1.1. A kísérletek során használt állatok

Kísérleteinket ivarérett hím (370 ± 30 g) Sprague-Dawley patkányokon végeztük. A patkányokat állandó, 21°C hőmérsékleten 75% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatok szabadon fogyaszthattak standard rágcsáló tápot és csapvizet.

A kísérleteket a Magyar Köztársaság (1998/XXVIII) állatvédelmi törvényei alapján, a Semmelweis Egyetem állatkísérletekkel kapcsolatos irányelveinek megfelelően végeztük.

7.1.2. Az I/R vesekárosodás műtéti protokollja

A műtéti beavatkozást intraperitoneális nátrium-pentobarbitál (50 mg/ttkg, Nembutal, Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) anesztéziában végeztük.

A műtét elvégzése alatt az állatok rektális hőmérsékletét hőmérséklet szabályozott operációs pad használatának segítségével állandó $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Mivel előkísérleteink során azt figyeltük meg, hogy 50 percnél rövidebb iszkémiás idő nem vezet súlyos akut veseelégtelenség kialakulásához, kísérleteink során 50 perces iszkémiás időt alkalmaztunk.

Az altatást követően medián laparotomiát végeztünk. A bal vesét ellátó artériát és vénát kipreparáltuk, majd 50 percre atraumatikus, mikrovaszkuláris klippel leszorítottuk (Biemeier, Aesculap, Németország).

Az iszkémia időtartama alatt a hasfalat ideiglenesen bezártuk. Az iszkémiás idő végezte előtt az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. A klip felengedése után a

műtéti nyílást véglegesen zártuk. Az állatokat a teljes ébredésig figyelemmel kísértük, majd ketreceikbe visszahelyeztük.

A fenti műtéti beavatkozást követően 24 óra reperfüziós idő elteltével az állatokat újra elaltattuk, majd kivéztettük.

Kontrollként uninefektomizált, áloperált, nem-iszkémizált hím állatok szolgáltak.

A levett vérből szérumot izoláltunk, melyet a további vizsgálatok elvégzéséig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk.

Az eltávolított bal vesét 3 egyenlő darabra osztottuk és 4%-os pufferolt formalinban ($\text{pH}=7,4$) vagy folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztást követően szintén $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

7.1.3. Kezelési csoportok

Az L-arginin és a nNOS gátlás hatásának vizsgálata céljából kísérleteinket az alábbi csoportokon végeztük úgy, hogy minden csoportba hét állatot vontunk be.

Az állatok első csoportja vivőanyag kezelést (DMSO és szezám olaj) kapott (I/R+veh csoport). A második csoportot L-argininnel kezeltük az iszkémia indukciója előtt hét napon át napi egyszeri, 2 g/ttkg adagban intraperitoneálisan (I/R+L-arg). A harmadik csoport szelektív nNOS gátlószert, 7-nitroindazolt (7-NI) kapott 7 napon át 50 mg/ttkg dózisban intraperitoneálisan az iszkémiát megelőzően (I/R+7-NI). Az állatok egy csoportja áloperáción esett át kezelés nélkül (sham). A vizsgálati csoportokat a 4. táblázatban foglaltam össze.

Csoport neve (n=7)	Kezelés	Dózis
sham	-	-
I/R+veh	Vivóanyag	-
I/R+L-arg	L-arginin	2 g/ttkg/nap
I/R+7-NI	7-nitroindazol	50 mg/ttkg/nap

4. táblázat A vese iszkémia/reperfúziós (I/R) vizsgálatba bevont állat csoportok adatai

7.2. Szérum kreatinin és karbamid (BUN) mérése

A vizsgált posztisztkémiás időpontban az aorta abdominalisból vett vérből, Hitachi-712 automatizált spektrofotométeren fotometriás módszerrel határoztuk meg a kreatinin és urea nitrogen (BUN) értékeket kereskedelmi forgalomban lévő kiték segítségével (Diagnosticum Kft, Budapest, Magyarország).

7.3. A veseszövetek szövettani vizsgálata

Az eltávolított vesék egy részét formalinos (4%, pH=7,4) fixálást követően paraffinba ágyasztuk. A szövetmintákat perjódsavas Schiff reakcióval (PAS) és hematoxillin-eozinnal (HE) festettük.

A szöveti károsodás fénymikroszkópos kiértékelése a minták kódolása után történt. A glomeruláris és a tubuláris károsodások, illetve a vaszkuláris károsodás mértékét 0-3-ig terjedő skálán minősítettük a következők szerint: 0- nincs, 1-enyhe (a sejtek <30 %-ban), 2-közepesen súlyos (a sejtek 30-60%-ban), 3-súlyos (a sejtek több, mint 60%-ban).

7.4. TUNEL festés

Az apoptózist kísérő DNS fragmentáció kimutatására TUNEL festést használtunk. A módszer lényege, hogy a DNS lánc törései miatt kialakuló szabad 3' hidroxil végeket deoxynucleotidil transferáz (TdT) enzim segítségével és jelölt dUTP-val detektáljuk. A TUNEL assay-hez kereskedelmi forgalomban levő kittet használtunk és a gyártó által megadott protokollt követtük (Boehringer Mannheim, Németország).

A pozitív, apoptotikus sejtek számát 40x nagyításon fénymikroszkóp alatt látóterenként számoltuk meg.

7.5. RT-PCR vizsgálatok

7.5.1. RNS izolálás

A kontroll és posztisztkémiás patkányokból nyert veseminta egy részét guanidin-isotiocianát lizispufferbe helyeztük és -80°C -on tároltuk a további molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig.

A szövetminták teljes RNS tartalmát a Qiagen kitt protokollja alapján, az RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A kivont RNS mennyiségét és összetételét spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Az RNS mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk.

7.5.2. Komplementer DNS (cDNS) szintézis

A reverz transzkripció (RT) során minden minta $1\ \mu\text{g}$ teljes RNS-éből konvertáltunk cDNS-t.

$20\ \mu\text{l}$ reakció végtérfogatban, $200\ \text{U}$ SuperScript II™ RNase H⁻ reverz transzkriptáz, $20\ \text{U}$ RNaseOUT™ inhibitor és $3,75\ \text{pg}/\mu\text{l}$ oligo dT₁₂₋₁₈ primer alkalmazásával (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). A reakcióelegyet 20°C -on 10 percig, majd 42°C -on 45 percig és végül 99°C -on 5 percig inkubáltuk, majd 4°C -ra lehűtöttük és a felhasználásig -20°C -on tároltuk.

7.5.3. Szemikvantitatív PCR reakciók (GAPDH, nNOS, iNOS, eNOS)

A szemikvantitatív PCR reakciókat 50 µl végtérfogatú [10% 10x PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM primer (sense és antisense egyaránt), 1,5 U rekombináns Taq polimeráz (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország)] reakcióelegyben végeztük Perkin Elmer Thermo Cycler[®] automatában (PE, Model 2400, Norwalk, CT, USA). Minden reakcióhoz 1 µl cDNS templátot használtunk.

A patkány specifikus nNOS, iNOS és eNOS mRNS szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid genetikai adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki. A primerek tervezéséhez a DNASTar[™] szoftvert használtuk. A patkány GAPDH specifikus primereket Strehlau és mtsai-tól vettük át (123). A PCR-ek során alkalmazott primerek adatait táblázatban foglaltuk össze (5. táblázat). A PCR reakciókat a primerekre jellemző annealing hőmérsékletek kivételével azonos módon vittük véghez. A kezdeti 5 perces 94 °C-on végzett denaturációt követően, a templátot 35 cikluson [94 °C, 15 s (denaturáció), 55 °C (iNOS, eNOS), 56°C (nNOS, GAPDH), 30 s (annealing), 72 °C 30 s (extenzió)] keresztül amplifikáltuk. Végül 7 percig tartó 72 °C-on történő inkubációval fejeztük be a PCR reakciót.

Gén	Primer párok	Annealing hőmérséklet (°C)	Termék hossza (bp)
nNOS	Forward: 5'-GAACCCCAAGACCATCC-3' Reverse: 5'-GGCTTTGCTCCCACAGTT-3'	56	308
iNOS	Forward: 5'-GGTTTCCCCCAGTTCCTCA-3' Reverse: 5'-TCTCCATTGCCCCAGTTTTT-3'	55	119
eNOS	Forward: 5'-AAG TGG GCA GCA TCA CCT AC -3' Reverse: 5'-GGT GAA CAT TTC CTG TGC TG -3'	55	396
GAPDH	Forward: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' Reverse: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	56	498

5. táblázat. A NOS izoformák veseszövetben mérhető mRNS expressziójának meghatározására használt primerek adatai.

PCR vizsgálatainkat minden esetben kétszer megismételve, pozitív és negatív kontrollok felhasználásával végeztük. A keletkezett terméket ethidium-bromiddal festett 2,5%-os agaróz gélen szeparálva tettük láthatóvá (Invitrogen, Frankfurt, Németország). A termékek várt hosszait 100 bp DNS marker mix (READY-LOAD™, Invitrogen, Frankfurt, Németország) párhuzamos futtatásával kontrolláltuk. A PCR reakciók eredményeit Gel-Pro™ denzitometriációs szoftverrel értékeltük ki.

7.6. Western Blot

7.6.1. Minta előkészítés

A Western blot vizsgálatokhoz 100 mg veseszövetet hűtött (4°C) lizáló pufferben [10 mM TRIS-HCl (1 M) pH=8,0, 60 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0,75 mg/l leupeptin, 1 mM/l EDTA, 1 mM/l EGTA (0,5 M), 0,5 mM PMSF, 0,1 mM dithiotreitol] (Sigma Chemical Co, MO, USA) Potter Elvehejm kézi homogenizálóval homogenizáltuk. A minták összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford-módszer szerint határoztuk meg. A minták fehérjekoncentrációját 10 µg/µl-re állítottuk be.

7.6.2. Antitestek

Primer patkány ellenes anti-iNOS és anti-eNOS ellenanyagként egér monoklonális ellenanyagot alkalmaztunk (Transduction Laboratories). Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal konjugált anti-egér IgG antitestet (Sigma Chemical Co, MO, USA) használtunk.

7.6.3. SDS-PAGE

A fehérje mintákat 4x SDS pufferben (12,5 mM TRIS-HCL, (pH 6,7), 4.0% SDS, 1 mM EDTA, 15% glicerol, 0,01% bromfenolkék) oldottuk fel, majd 5 percig forralással denaturáltuk.

A mintákból 50-50 µg összfehérjének megfelelő mennyiséget vittünk fel 12,5 % SDS-poliakrilamid gélekre. Koncentráló gélként 4 %-os SDS-poliakrilamidot használtunk. Mintáink mellett párhuzamosan molekulásúly markert (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) futtattunk. A gélelektroforézist másfél órán keresztül 110 V-on, 40 mA-rel végeztük.

7.6.4. Blottolás

A fehérje mintákat az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Hybond™ ECL™, AP Biotech, Buckinghamshire, UK) elektroblottoltuk (70 V, 220 mA, 90 perc), TRIS-HCl, glicin és metanol tartalmú standard transzfer pufferben, hűtött rendszerben.

A blottolás sikerességét 1% Ponceau S (Sigma Chemical Co, MO, USA) és 25 % ecetsav (Reanal Rt, Budapest, Magyarország) tartalmú festék keverékkel ellenőriztük.

7.6.5. Immunoblottolás

A blottmembránt 4 °C-on, egy éjszakán keresztül blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10% PBS puffer) inkubáltuk.

Blokkolás után a membránt mosó oldatban (1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween™20 detergens, 10% PBS puffer) másfél órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk az első specifikus ellenanyaggal (iNOS 1:250, eNOS 1:200 hígításban).

Háromszor 15 perc mosást követően a másodlagos, torna-peroxidázzal jelölt ellenanyaggal (1:2000 anti-egér IgG hígításban) a membránokat 60 percig inkubáltuk, majd további mosásokkal (3 x 20 perc) távolítottuk el a feleslegben kötött ellenanyagot.

7.6.6. Detektálás

Az immunoreaktív helyek kemolumineszcens szignálját Amersham Pharmacia előírása szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECL™-en filmen (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk, majd Gel-Pro™ szoftver alkalmazásával denzitometráltuk.

7.7. Allélspecifikus PCR vizsgálatok

7.7.1. Mintagyűjtés

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok vizsgálatát a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának perinatális intenzív osztályán, illetve az I. Sz. Gyermekklinikán gondozott, 2000 g alatti születési súlyú (LBW) koraszülöttek fenolketonúria vizsgálat céljára gyűjtött szűrőpapíros vércsepp mintáiból végeztük.

A vérmintákat kódoltuk és a genetikai vizsgálatokat végző személyekhez csak a kódolt, névvel el nem látott minták jutottak.

A klinikai adatokat kérdőívek segítségével nyertük (szintén kódolt). A vizsgálatokat a Helsinki-deklaráció értelmében, a résztvevők írásos tájékoztatása és beleegyezése után, a Semmelweis Egyetem etikai engedélyével (TUKÉB 16/2003) végeztük.

7.7.2. Betegcsoportok

105 ROP miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval kezelt, illetve 127 krioterápiás, illetve fotokoagulációs kezelést nem igénylő ROP-ban szenvedő kis születési súlyú koraszülött (LBW) esetében határoztuk meg a eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok előfordulását. A betegek klinikai adatait a 6. táblázatban foglaltam össze.

	ROP miatt nem kezelt kisműlyű koraszülöttek	ROP miatt kezelt kisműlyű koraszülöttek	P érték
Betegek száma	127	105	
Fiú/lány (N)	60/67	67/38	0,017
Születési kor (hét)	30,5±3,5	28,4±2,5	0,0001
Születési súly (g)	1300±400	1150±360	0,003
Oxigén terápia időtartama (nap)	7 [0-47]	15 [0-92]	0,0001

6. táblázat. Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusainak vizsgálatába bevont 232 kis születési súlyú koraszülött klinikai adatai.

7.7.3. DNS izolálás

A polimorfizmus vizsgálatokhoz szükséges genomiális DNS-t a szűrőpapírra vett vérből izoláltuk. A szűrőpapírból kivágtott, mintegy 10 mm² felületű mintára 200 µl 5%-os Chelex 100-at mértünk. Ezután a mintákat előbb 90 percig 56°C-on, majd 10 percig 100°C-on inkubáltuk. Az így előkészített mintákat szobahőmérsékletűre hűtöttük, majd gondosan megkevertük. Végül 10000 rpm-en 2 percig centrifugáltuk a mintákat. A további vizsgálatokig a felülúszót -20°C-on tároltuk.

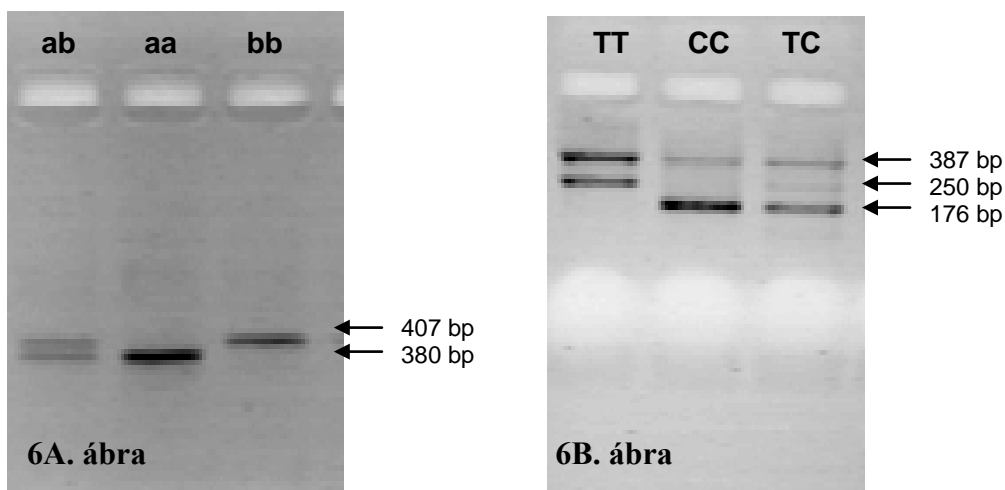
7.7.4. Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat polimorfizmusok detektálása

Az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus aléllspecifikus genotipizálásához használt primerek tervezése céljából a humán specifikus eNOS genomiális szekvenciát az NCBI (National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid genetikai adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki. A primerek tervezése a szekvenciák alapján ismét a DNASTM szoftver felhasználásával történt (7. táblázat).

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmust Nasreen és mtsai-nak (124) módszere szerint allélspecifikus PCR reakcióval detektáltuk. (7. táblázat)

Az allélspecifikus PCR reakciókat 50 µl végtérfogatú [10% 10x PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM primer (forward és reverse egyaránt), 1 U rekombináns Taq polimeráz (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország)] reakcióelegyben végeztük Perkin Elmer Thermo Cycler[®] automatában (PE, Model 2400, Norwalk, CT, USA). Minden reakcióhoz 2 µl DNS templátot használtunk. Az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus detektálásához a mintákat 60 °C annealing hőmérsékleten 38 cikluson keresztül amplifikáltuk, az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus detektálásához 56 °C-on szintén 38 cikluson át amplifikáltuk.

A keletkezett termékeket ethidium bromiddal festett 3%-os agaróz gélen, 100 bp DNS marker mix READY-LOAD[™] (Invitrogen, Frankfurt, Németország) párhuzamos futtatásával detektáltuk. (6A-B. ábra)



6A-B. ábra Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok allélspecifikus PCR analízisének gél futtatási képe.

Az eNOS 27-bp repeat és T⁻⁷⁸⁶C és polimorfizmusok detektálása allélspecifikus PCR reakcióval történt.

A 27-bp repeat polimorfizmus esetében a specifikus primerekkel végzett amplifikáció heterozigóta genotípus (ab) fennállása esetén egy 407 és 380 bázispáros (bp) terméket eredményezett. Homozigóta vad (bb) genotípus esetében egy 407 bp-os, homozigóta mutáns genotípus esetén (aa) egy 380 bp-os terméket detektáltunk (6A. ábrázat).

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus genotipizálása során a homozigóta vad genotípus (TT) egy 387 és egy 250 bp-os szakaszt eredményezett. A heterozigóta genotípus (TC) fennállása esetén három terméket (387, 250, 176 bp) detektáltunk. Homozigóta mutáns genotípus (CC) egy 387 bp-os és egy 176 bp-os termékszakaszt adott.

Gén	Primer szekvenciák
eNOS T ⁻⁷⁸⁶ C	Forward primer T: 5'-CAT CAA GCT CTT CCC TG <u>T</u> CT-3'
	Reverse primer T ₀ : 5'-AGG CCC AGC AAG GAT GTA GT-3'
	Forward primer C: 5'-GG <u>C</u> AGA GGC AGG GTC AG <u>A</u> CG-3'
	Reverse primer C ₀ : 5'-TTT CTC CAG CCC CTC AGA TG-3'
eNOS 27-bp repeat (b/a)	Forward: 5'-TGG GGG AGA TCC TTG CCT TTT C -3'
	Reverse: 5'- TGA GGG GCT GCA CTG GAC TGG -3'

7. táblázat. Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat polimorfizmusok meghatározására használt primerek adatai.

7.8. Statisztikai analízis

Az állatkísérletes adatokat átlagérték \pm SD (standard szórás) értéként adtuk meg.

A hisztológiai eredményeket Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Két csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

A különböző csoportok RT-PCR, Western blot eredményeinek összehasonlításához ANOVA tesztet használtunk Newman-Keul post-hoc teszttel kiegészítve.

A klinikai adatok összehasonlítását a ROP miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval nem kezelt és a ROP miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval kezelt, kis születési súlyú koraszülöttek között Student's t- teszttel végeztük.

A koraszülött populáció vizsgálata során az eNOS 27-bp repeat és T⁻⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmusainak allél és genotípus frekvenciáit, illetve haplotípus megoszlását χ^2 teszttel és Fisher exact teszttel vizsgáltuk.

Logisztikus regressziós analízist végeztünk annak érdekében, hogy az eNOS genotípusok és a ROP kezelés összefüggését megállapítsuk. Az asszociációt a ROP szakirodalom alapján ismert rizikó faktorokra (nem, születési kor, oxigén kezelés időtartama és a kettő interakciója) korigáltuk.

A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatát és ROP miatt kezelt, illetve a nem kezelt populáció allél prevalencia vizsgálatát az Arlequin™ szoftverrel (<http://lgb.unige.ch/arlequin/>; [Swiss National Science Foundation](#)) végeztük.

A statisztikai elemzések végrehajtásához a STATISTICA.6 szoftvert (StatSoft® Inc., USA) használtuk.

Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,05$ értéket tekintettük.

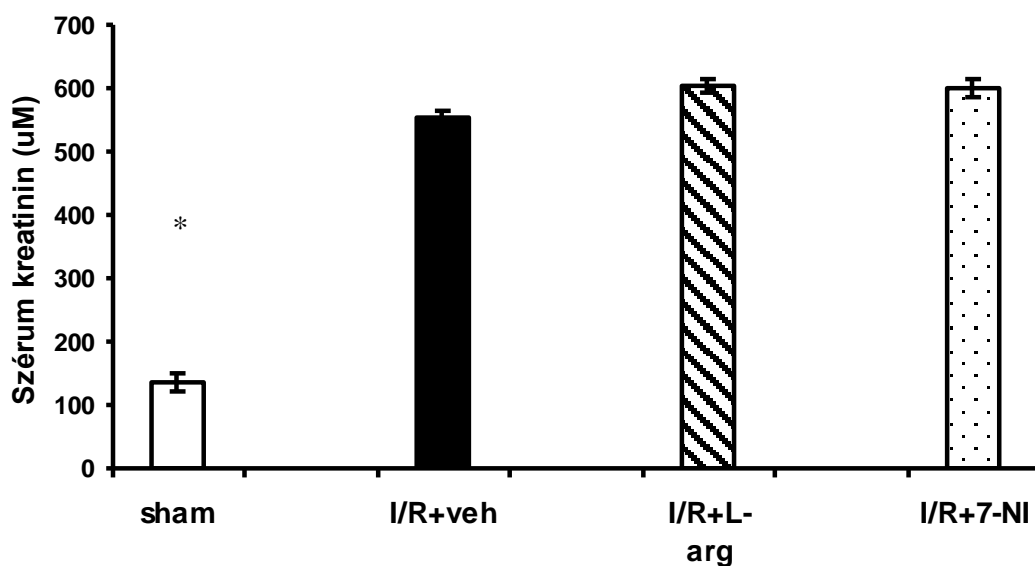
8. Eredmények

8.1. Az L-arginin és 7-NI kezelés hatása a vese I/R károsodására

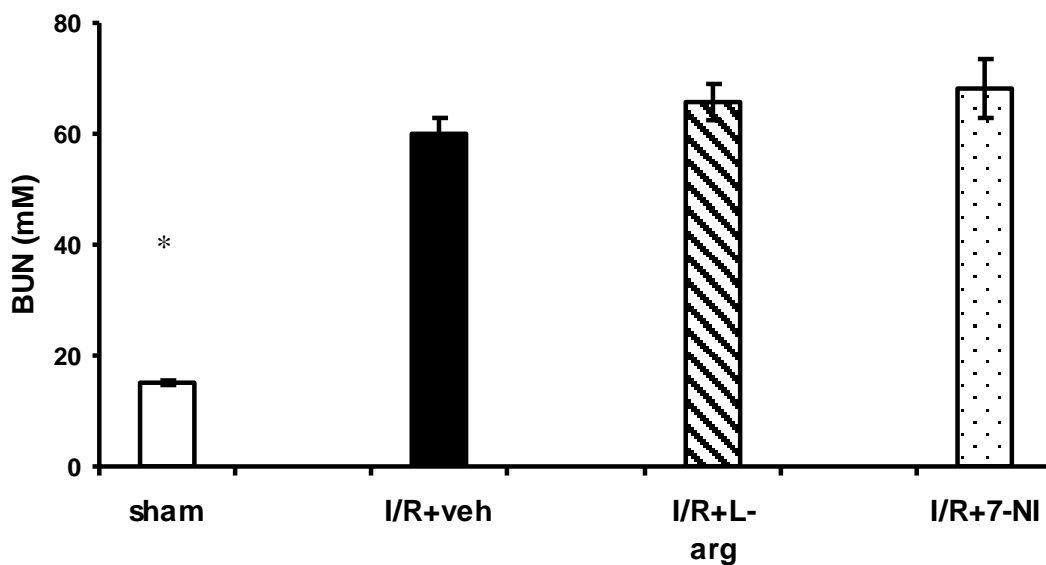
8.1.1. Vesefunkciós paraméterek

Az iszkémiás inzultust követően mindhárom csoportban szignifikánsan emelkedett szérum kreatinin és BUN értéket találtunk az áloperált állatokhoz képest, mely az iszkémia hatására kialakult súlyos akut veseelégtelenséget jelzi.

Nem találtunk azonban különbséget az I/R kezelési csoportok és a vivőanyag kezelt (I/R+veh) állatok között ($P>0,05$). (7A-B. ábra)



7A. ábra



7B. ábra

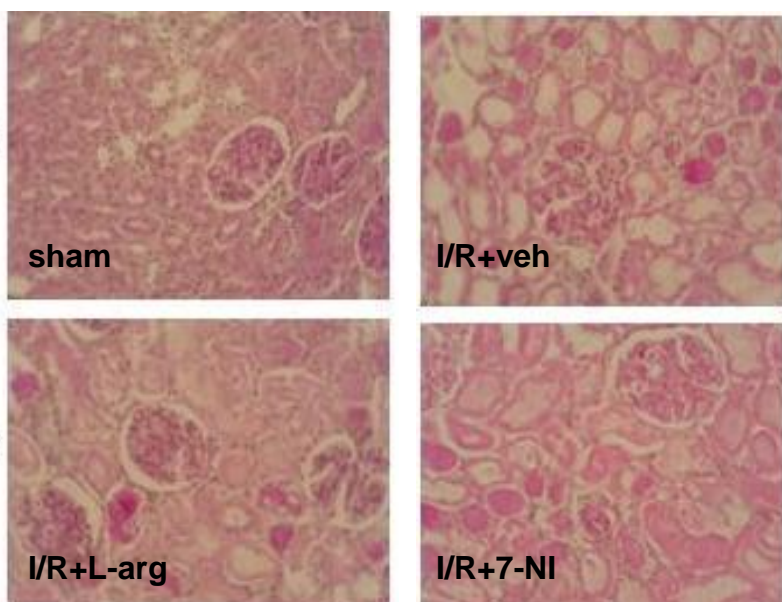
7A-B. ábra Áloperált (sham) és vivőanyaggal (I/R+veh), L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) vese iszkémiát szenvedett patkányok szérum kreatinin (7A.) és BUN (7B.) értéke. Minhárom I/R csoportban szignifikánsan emelkedett a szérum kreatinin és BUN értéke ($P < 0,01$ vs. I/R+veh, I/R+L-arg, I/R+7-NI). Az I/R kezelési csoportok között ugyanakkor nem volt szignifikáns különbség a vizsgált vesefunkciós paramétereket illetően.

8.1.2. A vese szövettani vizsgálata

Mindhárom I/R csoportban súlyos iszkémiás károsodás szöveti képe alakult ki az áloperált állatokhoz képest.

Súlyos tubuláris nekrózis, a vesetubulusokban hialin felszaporodása, a glomerulusok összeesése, illetve vaszkuláris károsodás alakult ki (8. táblázat).

Nem találtunk ugyanakkor különbséget a kezelési csoportok és a vivőanyag kezelt I/R csoport között a szöveti károsodás mértékét illetően. ($P>0,05$) (8. ábra).



8. ábra Áloperált (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh), L-argininnel (I/R+L-arg) és 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok posztiszkémiás veséjének HE-nal festett szövettani képe.

Az I/R vesekárosodást szenvedett állatok veséjében súlyos akut veseelégtelenség szövettani képe alakult ki. Nem volt különbség az I/R kezelési csoportok között a vesekárosodás mértékét illetően.

Csoport	Glomeruláris károsodás (score 0-3)	Vaszkuláris károsodás (score 0-3)	Tubuláris károsodás (score 0-3)
Áloperált (sham)	0,43±0,49*	0±0*	0,86±0,6*
I/R+veh	1,86±0,64	0,71±0,45	3±0
I/R+L-arg	1,75±0,66	0,87±0,93	3±0
I/R+7-NI	1,57±1,17	1±0,53	3±0

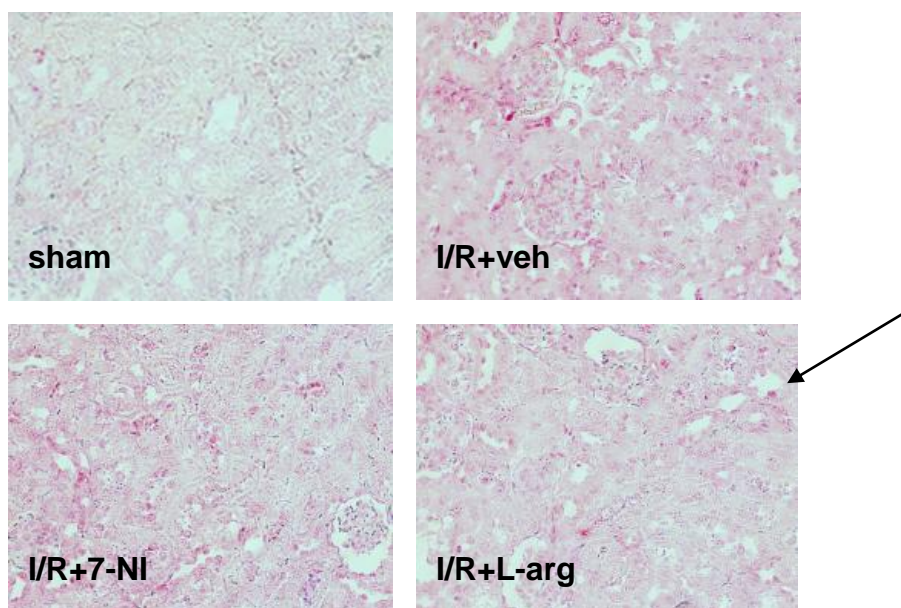
8. táblázat A vesekárosodás hisztológiai mértékének kiértékelése

P<0,01 vs. I/R+veh, I/R+L-arg, I/R+7-NI

8.1.3. TUNEL-festés

A TUNEL festés segítségével meghatározott apoptotikus sejtek száma szignifikánsan magasabb volt az iszkémiás károsodást szenvedett patkányok veséjében áloperált állatokhoz képest (*P*<0,01).

Nem találtunk ugyanakkor különbséget a kezelt csoportok és a vivőanyag kezelt I/R állatok között az apoptotikus sejtek számában (*P*>0,05) (9. ábra).



9. ábra Áloperált állatok (sham), illetve vivőanyag kezelt (I/R+veh), valamint L-argininnel (I/R+L-arg) és 7-nitroindazollal (I/R+7-NI) kezelt patkányok posztisztkémiás veséjének TUNEL módszerrel festett képe.

A TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek száma szignifikánsan emelkedett az I/R csoportokban áloperált állatokhoz képest ($P < 0,01$).

Sem az L-arginin, sem a 7-NI nem változtatta meg a veseszövetben található apoptotikus sejtek számát vivőanyag kezelt I/R csoporthoz képest. A nyíl egy reprezentatív TUNEL-pozitív apoptotikus sejtre mutat.

8.1.4. A NOS izoformák mRNS és fehérje expressziója

8.1.4.1. Az I/R hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

A nNOS mRNS expressziója szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$), az iNOS mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett ($P < 0,05$), ugyanakkor az eNOS mRNS expressziója nem változott az I/R+veh csoportban sham operált állatokhoz képest (10, 11, 12. ábra).

Az iNOS fehérje expressziója az mRNS expresszióinak megfelelő mértékben emelkedett ($P < 0,05$), az eNOS fehérje expressziója szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$) az I/R+veh csoportban áloperált állatokhoz viszonyítva. (13, 14. ábra)

8.1.4.2. Az L-arginin hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

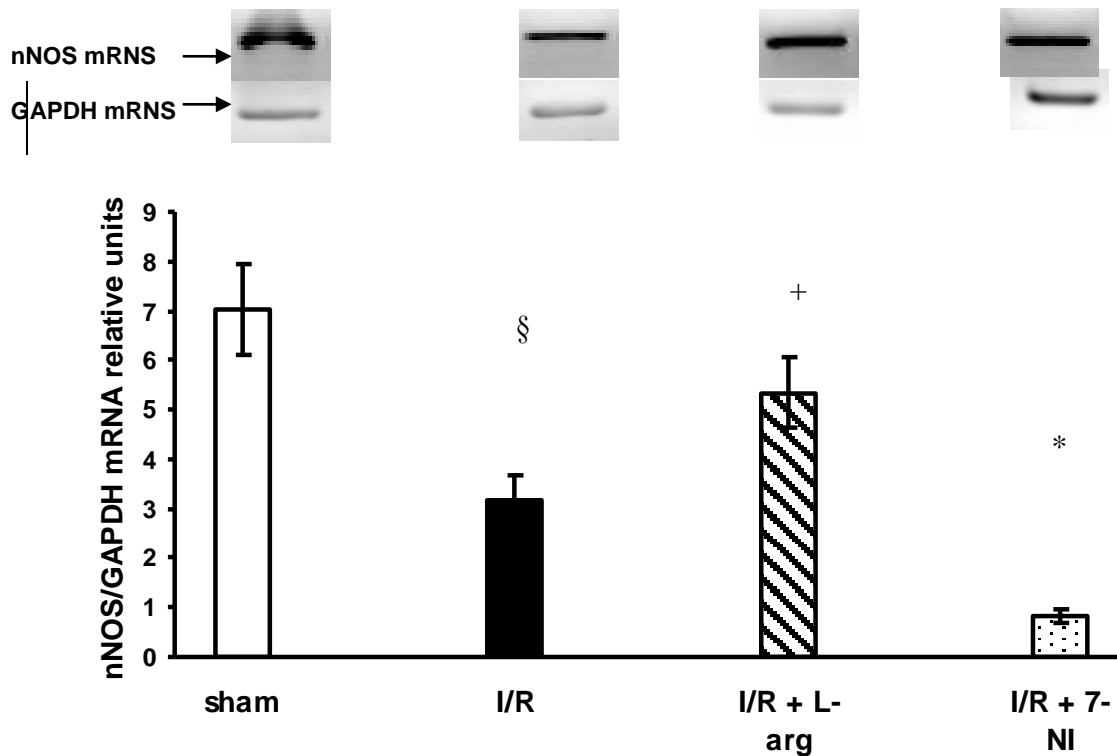
L-arginin alkalmazása mindhárom NOS enzim izoforma mRNS expresszióját növelte a vivőanyag kezelt I/R csoporthoz képest ($P < 0,05$). (10, 11, 12. ábra)

Ezzel szemben a vizsgált NOS izoformák közül csak az iNOS fehérje expressziója emelkedett szignifikánsan az L-arginin kezelt csoportban ($P < 0,05$) (13. ábra), az eNOS fehérje expressziójában nem találtunk szignifikáns különbséget a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($P > 0,05$) (14. ábra).

8.1.4.3. A 7-NI hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

A 7-NI kezelés csökkentette a nNOS mRNS expresszióját ($P < 0,01$ vs. I/R+veh) (10. ábra), de nem gyakorolt hatást az iNOS és eNOS mRNS expressziójára vivőanyaggal kezelt állatokhoz képest ($P > 0,05$) (11,12. ábra).

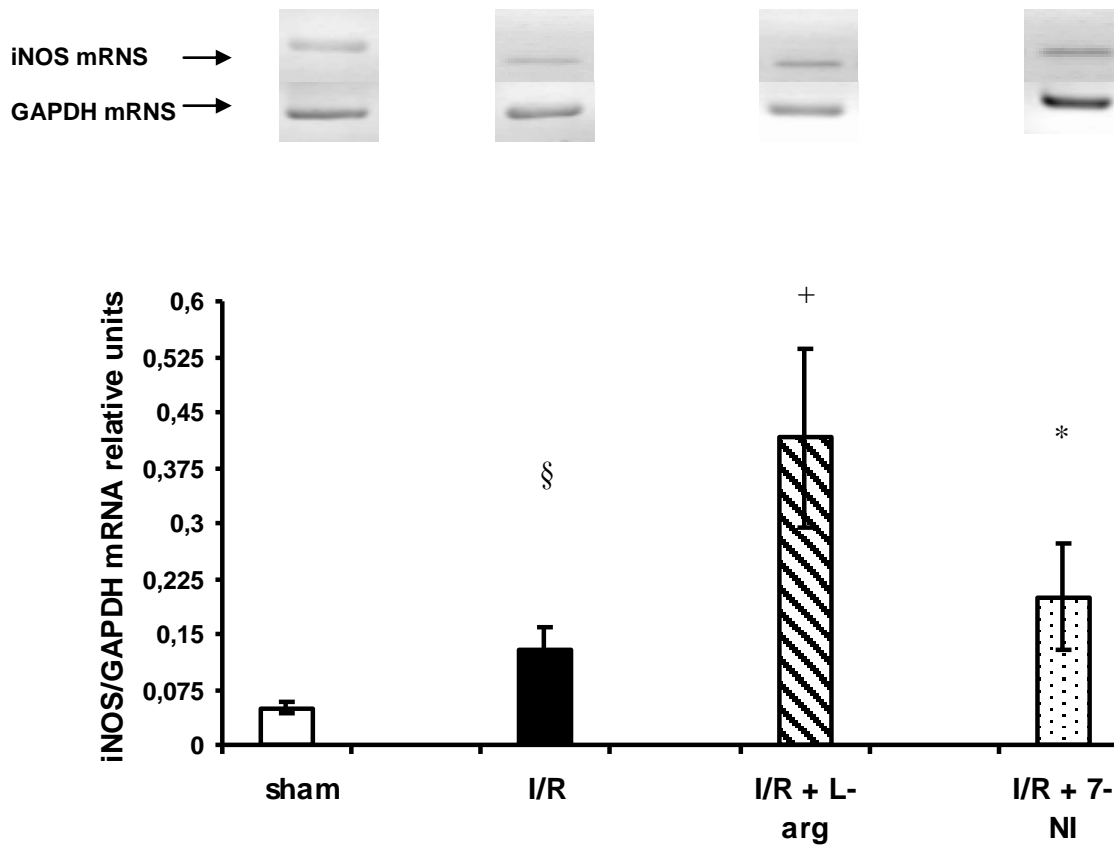
A 7-NI kezelt állatokban az iNOS fehérje expressziója csökkent ($P < 0,05$ vs. I/R+veh) (13. ábra), míg az eNOS fehérje szintézise nem változott a vivőanyag kezelt patkányokhoz képest ($P > 0,05$) (14. ábra).



10. ábra A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) mRNS expressziójának meghatározása RT-PCR technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok posztisztkémiás veséjében.

A nNOS mRNS expressziója szignifikánsan csökkent I/R+veh csoportban áloperált patkányokhoz képest. Az L-arginin kezelés emelte, a 7-NI kezelés csökkentette a nNOS mRNS expressziót az I/R+veh csoporthoz képest.

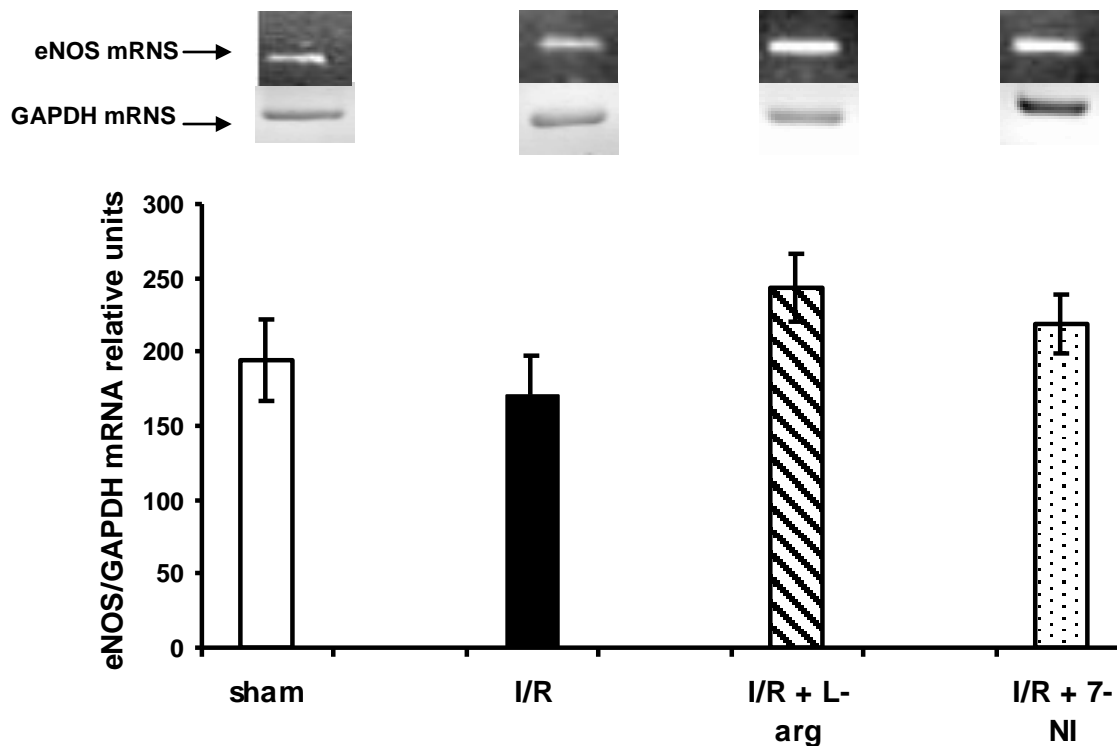
§ $P < 0,05$ vs. sham, * $P < 0,05$ vs. sham, I/R+veh, + $P < 0,05$ vs. I/R+veh



11. ábra Az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) mRNS expressziójának meghatározása RT-PCR technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), illetve 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok posztisztkémiás veséjében.

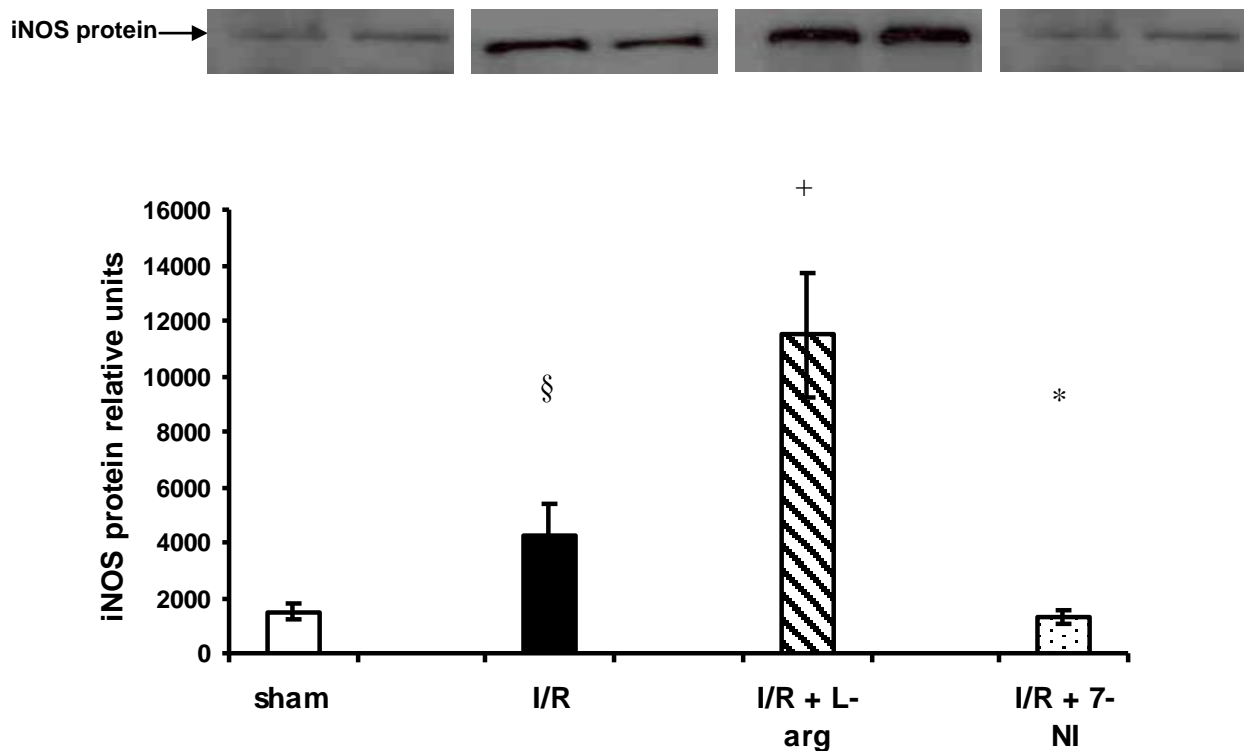
Az iNOS mRNS expressziója emelkedett az I/R+veh csoportban sham operált állatokhoz képest. Mind az L-arginin, mind a 7-NI kezelés növelte az iNOS mRNS expresszióját vivőanyaggal kezeltékhez képest.

§P<0,05 vs. sham, *P<0.05 vs. I/R+veh, +P<0.05 vs. I/R+veh.



12. ábra Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) mRNS expressziójának meghatározása RT-PCR technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok posztisztkémiás veséjében.

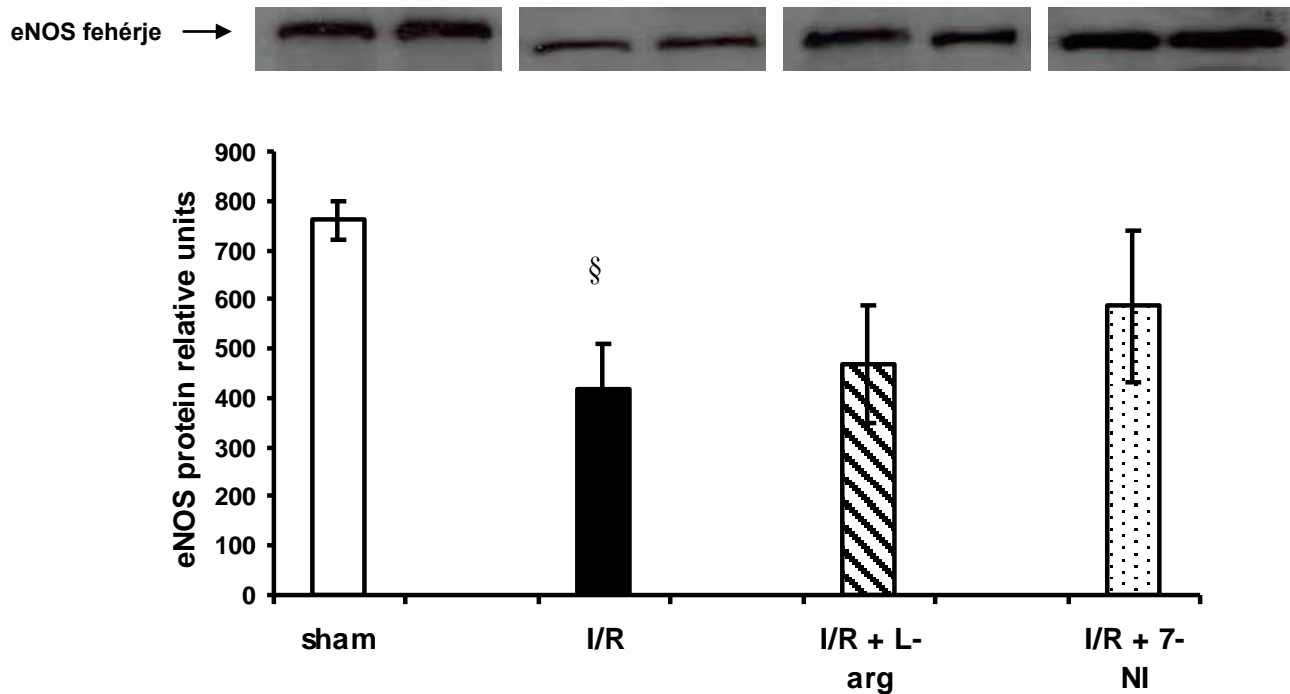
Az eNOS mRNS expressziója nem változott egyik kezelési csoportban sem áloperált állatokhoz képest.



13. ábra Az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) fehérje szintjének meghatározása Western blot technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok posztisztkémiás veséjében.

Az iNOS fehérje szintje szignifikánsan emelkedett az I/R+veh csoportban áloperáltakhoz képest. Az L-arginin kezelés növelte, a 7-NI kezelés csökkentette az iNOS fehérje expresszióját vivőanyaggal kezelt állatokhoz képest.

§P<0,05 vs. sham, *P<0.05 vs. I/R+veh, +P<0.05 vs. I/R+veh



14. ábra Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) fehérje szintjének meghatározása Western blot technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), illetve 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok posztisztkémiás veséjében.

Az eNOS fehérje szintje szignifikánsan csökkent az I/R+veh csoportban áloperált patkányokhoz képest.

§ $P < 0,05$ vs. sham.

8.2. Az eNOS 27-bp repeat és T⁷⁸⁶C polimorfizmusok gyakorisága és a koraszülöttek retinopátiája közötti kapcsolat

Az allélspecifikus PCR reakció segítségével végzett genotipizálás során az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus genotípus eloszlása szignifikánsan különbözött a ROP miatt kezelt és nem kezelt kisműlyú koraszülöttek között ($P=0,015$).

Ugyanakkor nem találtunk különbséget az eNOS T⁷⁸⁶C polimorfizmus megoszlásában a két vizsgálati csoport között ($P=0,984$) (9. táblázat).

Polimorfizmus	Genotípus	ROP miatt nem kezelt kisműlyú koraszülöttek (n=127)	ROP miatt kezelt kisműlyú koraszülöttek (n=105)	Odds ratio (95% CI)	P érték
<i>eNOS 27-bp repeat (b/a)</i>	bb	90	60	1,82 (1,14-2,91)	0,015
	ab	36	39		
	aa	1	6		
<i>eNOS T⁷⁸⁶C</i>	TT	55	47	0,95 (0,64-1,40)	0,984
	TC	60	79		
	CC	12	9		

9. táblázat Az eNOS 27-bp repeat és eNOS T⁷⁸⁶C polimorfizmusok genotípus megoszlása retinopátia miatt kezelt és nem kezelt kisműlyú koraszülöttekben.

Az eNOS 27-bp repeat és T polimorfizmusok allél frekvenciák meghatározása során azt találtuk, hogy sem az eNOS 27-bp repeat „a”, sem az eNOS T⁷⁸⁶C mutáns allél frekvenciája nem különbözött a két vizsgálati csoportot összehasonlítva ($P=0,153$ és $P=0,867$) (10. táblázat).

Logisztikus regressziós vizsgálat segítségével ki tudtuk mutatni, hogy a homozigóta mutáns aa genotípus és a kezelést igénylő ROP kialakulása között szignifikáns összefüggés van ($P=0,047$ vs. ab genotípus és $P=0,022$ vs. bb genotípus). Továbbá eredményeink azt mutatták, hogy a fiú nem és a ROP kialakulása között is kapcsolat van ($P=0,046$ vs. lányok) (11. táblázat).

Polimorfizmus	Allél	ROP miatt nem kezelt kisműlyű koraszülöttek (%)	ROP miatt kezelt kisműlyű koraszülöttek (%)	Odds ratio (95% CI)	P érték
<i>eNOS</i> 27-bp repeat (b/a)	b / a	85% / 15%	76% / 24%	1,79 (0,87-3,66)	0,153
<i>eNOS</i> T ⁷⁸⁶ C	T / C	67% / 33%	68% / 32%	0,95 (0,64-1,40)	0,867

10. táblázat Az *eNOS* 27-bp repeat és *eNOS* T⁷⁸⁶C polimorfizmusok allél frekvenciája retinopátia miatt kezelt és nem kezelt kisműlyű koraszülöttekben.

Változó	Odds ratio (95% CI)	P érték
Fiú nem	1,87 (1,26-4,15)	0,046
Gesztációs kor	0,87 (0,71-1,02)	0,071
Oxigén kezelés időtartama	1,20 (0,99-1,40)	0,082
Gesztációs kor: oxigén kezelés időtartama	0,99 (0,98-1,00)	0,117
<i>eNOS</i> 27-bp repeat aa vs. ab	0,10 (-2,13- 2,34)	0,047
<i>eNOS</i> 27-bp repeat aa vs. bb	0,08 (-2,12-2,28)	0,022

11. táblázat A többszörös logisztikus regresszió eredménye.

A haplotípus eloszlásokat megvizsgálva azt találtuk, hogy az eNOS aT és bT haplotípusok gyakorisága szignifikánsan magasabb a ROP kezelést igénylő koraszülöttekben a nem kezeltékhez képest ($P = 0,0001$ és $P = 0,0036$) (12. táblázat).

Pozíció		ROP miatt nem kezelt kissúlyú koraszülöttek (%)	ROP miatt kezelt kissúlyú koraszülöttek (%)	Odds ratio (95% CI)	P érték
27-bp repeat	-786				
a	T	7	28	0,19 (0,09-0,45)	0,0001
a	C	17	17	1,01 (0,51-2,00)	0,971
b	T	85	97	0,17 (0,05-0,58)	0,004
b	C	48	47	1,06 (0,63-1,77)	0,940

12. táblázat Az eNOS 27-bp repeat és eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmusok genotípus megoszlása alapján becsült haplotípusok megoszlása retinopátia miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttekben.

9. Megbeszélés

9.1. A NOS izoformák expressziójának változása vese iszkémia/reperfúziós károsodásban

Munkánk során vizsgáltuk a nNOS, iNOS és eNOS izoformák expressziójának változását posztiszkémiás patkányok veséjében az iszkémiás inzultust követően 24 órával.

A két konstitutív izoforma közül a nNOS mRNS expressziója csökkent, az eNOS mRNS expressziója ugyanakkor nem változott a vesében.

Az iNOS mRNS expressziója ezzel szemben szignifikánsan emelkedett áloperált patkányokhoz viszonyítva.

Fehérje expressziós szinten ugyanakkor csökkenést tudunk kimutatni az eNOS esetében is, az iNOS fehérje szintje pedig az mRNS expressziójának megfelelően emelkedett.

Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban eddig megjelent, az iNOS expresszióját vese I/R károsodás során vizsgáló munkával.

Okusa és mtsai szerint az iNOS aktivitás megemelkedik az I/R vesekárosodás első 24 órájában a vese kortextben és a medullában a mért nitrit és nitrát felszabadulás alapján (47). A reperfúziót követő 7. napra a kortextben visszatér a normális szintre, de a medullában továbbra is emelkedett marad a szintje. Kosaka és mtsai-nak (132), valamint Vinas és mtsai-nak megfigyelései szerint az iNOS enzim mRNS és fehérje expressziója már 7 órával az iszkémiát követően megnövekszik a veseszövetben (61).

Az iszkémiát követően a veseszövetben kialakuló acidózis, valamint a TNF- α felszabadulás képes csökkenteni az eNOS expresszióját.

Ez összhangban van azzal, hogy kísérleteink során mi is az eNOS fehérje expresszió csökkenését detektáltuk a posztiszkémiás veseszövetben áloperált állatokhoz képest.

Ezzel szemben Vinas és mtsai ennek az ellenkezőjét, az eNOS mRNS és fehérje szint emelkedését figyelték meg az iszkémiát követő 24. órában.

A két különböző megfigyelés egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy Vinas és mtsai 45 perces iszkémiás idővel dolgoztak. Előzetes vizsgálataink szerint a jelen

munkánkban használt 50 perces iszkémia a 45 perces iszkémiás időhöz képest szignifikánsan súlyosabb szöveti károsodást okoz a vesében (125).

Feltételezzük, hogy az ennek hátterében zajló molekuláris mechanizmusok hozzájárulhatnak az eNOS expresszió ellenkező változásához.

A nNOS mRNS expressziójában csökkenést tudunk kimutatni az iszkémiás inzultust követően 24 órás reperfúzió után.

Vinas és mtsai ugyanakkor nem találtak változást a nNOS mRNS expressziójában a már fent idézett munkájuk során. Bár hasonló tendenciájú változást (csökkenés) figyeltek meg, ez nem érte el a szignifikancia szintjét. Véleményünk szerint a különbség magyarázatául jelen esetben is a korábban részletezett eltérő iszkémiás idő szolgálhat. Nagyon fontos azonban hangsúlyozni, hogy Vinas és mtsain kívül más nem határozta meg eddig a nNOS expresszió változását vese I/R során (61).

Mivel a neuronális izoforma a legnagyobb mennyiségben az idegrendszer sejtjeiben található, számos kísérletes munka vizsgálta a nNOS viselkedését és szerepét agyi iszkémia során.

Agyi iszkémiát követően a kezdeti szakaszban, már az iszkémiát követően 10 perccel a nNOS expresszió emelkedik, majd 60 perc múlva visszatér a kiindulási szintre (126). Ezt követően az iszkémiás szöveti károsodás előrehaladtával elpusztul a nNOS-t termelő neuronok nagy része, így a nNOS expressziója is szignifikánsan lecsökken (127).

A nNOS a veseszövetben a legnagyobb mennyiségben a macula denza sejtekben, illetve az idegvégződésekben van jelen, de megtalálható az endotél és tubulus sejtekben is.

Feltételezzük, hogy a kísérleteink során detektált nNOS expresszió csökkenésének oka az I/R károsodás következtében kialakult tubulus sejt pusztulás és az endoteliális funkció zavar.

Bár nem rendelkezünk ezzel kapcsolatos irodalmi adattal, de elképzelhető, hogy az eNOS-iNOS kapcsolatával analóg módon, a posztiszkémiás veseszövetben megemelkedett iNOS általi NO termelés elnyomhatja a nNOS aktivitását, valamint expresszióját.

9.2. Az L-arginin hatása vese iszkémia/reperfúziós károsodásban

Munkánk második célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk az L-arginin kezelés hatását vese I/R károsodásban, különös tekintettel az L-arginin veseszövet károsodásra, illetve a különböző NOS enzim izoformák expressziójára gyakorolt hatására.

Ugyan az L-arginin iszkémia indukált patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepét az utóbbi években számos kísérleti munka vizsgálta, az általa kifejtett hatás ma sem egyértelmű.

Ezen felül az L-arginin és a NOS izoformák mRNS, valamint fehérje expressziójának összefüggéseiről kevés irodalmi adattal rendelkezünk.

Jelen munkánkban egyoldali vese I/R károsodás kiváltása előtt az állatokat hét napon keresztül előkezeltük L-argininnel 2g/ttkg/nap dózisban.

A károsodott vese szövettani vizsgálata, illetve a vesefunkciós paraméterek változása (szérum kreatinin és BUN) azt mutatták, hogy az L-arginin alkalmazása nem befolyásolta a vese I/R károsodásának mértékét.

Nem találtunk továbbá különbséget a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számában sem a vivőanyag kezelt csoporthoz képest.

A szakirodalmi adatokat áttekintve összefoglalóan elmondhatjuk, hogy eredményeink összhangban vannak Raff és mtsai-nak vizsgálataival, akik kísérleteik során megfigyelték, hogy sem az iszkémia alatt, sem a reperfúzió első 14 napja alatt alkalmazott L-arginin kezelés nem változtatta meg a szöveti károsodás, illetve apoptózis mértékét vese I/R károsodást követően (71).

Ezzel szemben több kísérleti munka az L-arginin adás protektív vagy ezzel éppen ellenkező, azaz káros hatását igazolta vese I/R károsodásban (70,69).

A különböző eredményeket diszkutálva azonban nagyon fontos megjegyezni, hogy a legtöbb vizsgálatban különböző dózisban, eltérő időn keresztül és más beviteli úton alkalmazták az L-arginint. A legtöbb munka esetében eltérő volt az iszkémiás és reperfúziós idő is.

Jerkic és mtsai az iszkémia előtt négy hétig szájon át kezelték a patkányokat L-argininnel. Kutatócsoportunk a jelen vizsgálatban, ahogyan azt korábban is részleteztük, az iszkémia előtt 7 napig szájon át alkalmazta az L-arginint. Az L-arginin dózisa 2 g/ttkg/nap volt, amely megfelel Jerkic és mtsai által alkalmazott dózishoz.

Feltételezzük, hogy kísérleteinkben Jerkic és mtsai-nak eredményeivel szemben azért nem fejtett ki hatást az L-arginin a veseszövet károsodásának kialakulására, mert hosszabb iszkémiás időt alkalmaztunk.

Schramm és mtsai a reperfúzió alatt intravénásan kezelték a patkányokat L-argininnel és Jerkic és mtsainak vizsgálataihhoz hasonlóan ki tudták mutatni, hogy az L-arginin adása csökkentette a vese posztiszkémiás károsodását (70).

Ezzel szemben Raff és mtsai-nak már korábban idézett vizsgálat sorozatában a reperfúzió alatt alkalmazott L-arginin nem befolyásolta a vesekárosodást (71).

Tome és mtsai ugyanazon kísérlet sorozaton belül tudták megfigyelni, hogy a közvetlenül iszkémia előtt alkalmazott L-arginin javította, de a reperfúzió után 7 napon át ugyanabban a dózisban alkalmazott L-arginin rontotta a vese funkcióját vese iszkémiát követően (128).

Szívizom iszkémiában a különböző időpontokban adott L-arginin szintén egymással ellentétes hatást fejt ki (129). Tíz perccel az iszkémia kiváltása előtt, illetve 50 perccel az iszkémia után adott L-arginin (korai kezelés) javította a szív pumpafunkcióját, ugyanakkor az iszkémiát követően 3 és 4 órával (késői kezelés) alkalmazott L-arginin rontotta azt.

Összefoglalva, jelen vizsgálatunk eredménye és a fent részletezett szakirodalmi adatok együtt arra utalnak, hogy az L-arginin posztiszkémiás szöveti károsodásra kifejtett hatását kritikusan befolyásolja az alkalmazásának ideje (iszkémia előtt vagy után), illetve időtartama.

Jelen munkánkban sikerült kimutatnunk azt is, hogy az L-arginin megemeli mindhárom NOS izoforma mRNS expresszióját.

A legnagyobb, közel két és félszeres emelkedést az iNOS mRNS expressziójában tudtuk megfigyelni, mely összhangban van azzal, hogy a vizsgált fehérje expressziók közül az iNOS esetében detektáltunk emelkedést, míg az eNOS fehérje szintjében nem tudtunk változást kimutatni.

Ahogy korábban összefoglaltam, az iNOS által termelt nagy koncentrációjú NO fokozza a szöveti károsodást vese I/R-ban, ezzel szemben az eNOS által termelt NO-nak számos tubulus és endotél sejt védő hatást tulajdonítanak.

Feltételezzük, hogy az L-arginin hatása nagy mértékben függ attól, hogy az adott vizsgálati modellben -mint a NO szintézis szubsztrátja- melyik izoforma működését

milyen mértékben befolyásolja és ezen keresztül alacsony vagy nagy koncentrációjú NO termelődést serkent.

A kísérleti protokoll, az L-arginin alkalmazásának időpontja és időtartama, illetve dózisa alapvetően befolyásolhatja azt, hogy az adott vizsgálati időpontban melyik izoformára milyen hatást fejt ki, hiszen a NOS izoformák expressziója is dinamikusan, az iszkémiás inzultust követően eltelt időtől függően változik vese I/R károsodásban.

Munkánkban az L-argininnel kezelt I/R csoportban mindhárom izoforma mRNS expressziója emelkedett, ami arra utal, hogy a NOS enzimek szubsztrát ellátásának fokozása az enzim mRNS szintézis indukciójához vezet.

Ez az eredmény első olvasatra meglepő, hiszen a nNOS és eNOS konstitutív enzimek, melyek aktivitásának szabályozása mai ismereteink szerint elsősorban poszttranszlációs szinten valósul meg.

Ugyanakkor korábban is megfigyelték már, hogy a NO szintézis egyik kofaktorának, a tetrahidrobiopterin termelődésének szintje képes indukálni a konstitutív izoformák termelődését (130).

Ennek alapján elképzelhető, hogy a NO szintézis szubsztrátja maga is képes lehet a konstitutív NOS enzimek indukciójára. Annak meghatározására azonban, hogy ennek szabályozásában pontosan mely molekuláris biológiai mechanizmusok vehetnek részt, további kísérletes vizsgálatok szükségesek.

Kísérleteink során az L-arginin adás következtében létrejött mRNS expresszió változásokat az iNOS esetében kísérte a fehérje szint növekedése is.

Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy az iNOS expressziójának emelkedése lehet részben annak oka, hogy az L-arginin adás munkánkban nem bizonyult protektívnek.

Kosaka és mtsai, valamint Schneider és mtsai szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az L-arginin adás következtében létrejött iNOS szint és aktivitás változás közvetítheti részben az L-arginin adásának hatását (131,132).

Ugyan az ő kísérleteikben a mi eredményeinkkel szemben az L-arginin adása csökkentette a vese posztiszkémiás károsodását, ezt azonban az iNOS expressziójának szignifikáns csökkenése kísérte.

9.3. A 7-NI hatása vese iszkémia/reperfúziós károsodásban

A nNOS a vese iszkémia indukálta akut károsodásában betöltött szerepével kapcsolatban nagyon kevés szakirodalmi háttérrel rendelkezünk.

A nNOS izoformát először az idegrendszer sejtjeiben tudták kimutatni, ahol a NO elsősorban neurotranszmitterként funkcionál. Éppen ezért nem meglepő, hogy a legtöbb, a nNOS és a hipoxia/iszkémia indukált károsodás összefüggéseit vizsgáló munka is idegrendszeri modellt használ.

A központi idegrendszerben a nNOS aktivitás emelkedése fokozza a posztiszkémiás károsodás mértékét. A nNOS szelektív gátlása, valamint a nNOS gén deléciója csökkenti az agyi infarktus kiterjedését.

Hogy megvizsgáljuk a nNOS a vese posztiszkémiás károsodásában betöltött szerepét, a patkányok egy csoportját szelektív nNOS gátlószerrel, ún. 7-nitroindazollal (7-NI) kezeltük az iszkémia indukciója előtt.

Az irodalomban (133,134) korábban leírt 50 mg/ttkg-os napi dózisban az L-argininhez hasonlóan hét napon át alkalmaztuk a 7-NI-t.

Eredményeink azt mutatták, hogy a 7-NI kezelés nem változtatta meg a vese hisztológiai károsodásának mértékét, illetve a vesefunkció romlását, valamint nem találtunk különbséget a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számában sem.

Hasonló megfigyelést tettek Vinas és mtsai, akiknek a már korábban többször idézett munkájában a 7-NI kezelés nem fejtett ki hatást a vese posztiszkémiás károsodására (61).

A nNOS és az általa szintetizált NO a vesén belül többek között az afferens arteriolák dilatációjáért felelős, így elsősorban a tubulo-glomeruláris feedback szabályozásában tölt be központi szerepet.

A nNOS szelektív gátlása 7-NI adásával csökkenti a tubulo-glomeruláris feedback felé megnyilvánuló érzékenységet (135). Diabétesz, ill. magas vérnyomás betegség okozta végstádiumú vesebetegségben csökken a nNOS szintje a veseszövetben. A krónikus vesekárosodás mértéke csökkenthető a nNOS aktivitás emelésével, mely utal a nNOS védő szerepére. Alacsony nNOS expressziót mutató vese krónikus vesekárosodás modelljében gyorsabb progressziót mutat a különböző károsító tényezőkkel szemben (40).

Ezzel szemben jelen vizsgálatunk eredménye Vinas és mtsai-nak eredményeivel összhangban azt támasztja alá, hogy a nNOS akut iszkémiás vesekárosodásban nem játszik központi szerepet, mivel az enzim gátlása nem okozott változást a károsodás kimenetelében.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a nNOS az akutan kialakult patológiás folyamatokban nem befolyásolja a sejtek nekrozisát vagy apoptózisát szabályozó mechanizmusokat. Feltételezzük, hogy a nNOS elsősorban a finom hemodinamikai szabályozó folyamatokban vesz részt a vesében, olyan akut károsodás modellekben, mint az vese I/R, nem jut jelentős szerephez.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a 7-NI a különböző NOS enzim izoformák expressziójára kifejtett hatását is.

Eredményeink azt mutatták, hogy a 7-NI szignifikánsan csökkentette a nNOS mRNS expresszióját. Ez utalhat arra, hogy az enzim működésének gátlása elnyomja az enzim termelődését.

Ezenkívül kísérleteinkben sikerült kimutatnunk, hogy a 7-NI csökkentette az iNOS fehérje szintézisét is. Eredményeinkkel összhangban Qu XW és mtsai szintén leírták, hogy 7-NI szisztémás alkalmazása csökkentette az iNOS szintjét az ileumban és hasonló tendenciát tudtak megfigyelni a vesében is (136).

In vitro végzett vizsgálatok korábban igazolták, hogy a 7-NI gátolhatja az iNOS működését is, ugyanakkor nem specifikus iNOS gátló hatást nem találtak még in vivo.

Bár Wolff és mtsai in vitro vizsgálataikban azt is meg tudták figyelni, hogy a 7-NI adása gátolta az eNOS aktivitását, vizsgálatainkban nem találtunk különbséget az eNOS mRNS, illetve fehérje expressziójában 7-NI kezelést követően (137).

Összefoglalva mind az L-arg, mind a 7-NI megváltoztatta a NOS enzimek expresszióját I/R károsodást követően a vesében, súlyos posztiszkémiás vesekárosodás kimenetelét azonban nem befolyásolja.

9.4. Az eNOS genetikai polimorfizmusok és a koraszülöttek retinopátiájának összefüggései

Munkánk során elsőként vizsgáltuk az eNOS T⁻⁷⁸⁶C, valamint 27-bp repeat polimorfizmusok és a koraszülöttek retinopátiájának (ROP) kapcsolatát.

A hipoxia következtében kialakuló retinopátiákra a retinában zajló kóros érújdonképződés, neovaszkularizáció jellemző, mely később a retina leválásához és súlyosabb esetben akár vakság kialakulásához is vezethet.

A NO és az eNOS enzim központi szerepet játszik az angiogenetikus folyamatokban és különböző genetikai polimorfizmusainak szerepét számos munka vizsgálta már a szintén hipoxia indukálta diabéteszes retinopátiában (DR) (117-119).

De Syllos és mtsai (118), illetve Awata és mtsai (119) nem találtak összefüggést az eNOS T⁻⁷⁸⁶C, valamint 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok és a DR kialakulása között.

Ezzel szemben Taverna és mtsai-nak eredményei szerint az eNOS homozigóta mutáns genotípus (aa) véd a DR kialakulásával szemben (138).

Szintén Taverna és mtsai-nak vizsgálata szerint az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus a DR gyakoriságát ugyan nem, de annak megjelenési idejét befolyásolhatja.

Jelen vizsgálatainkban sikerült kimutatnunk, hogy a csökkent eNOS termeléssel járó eNOS 27-bp repeat polimorfizmus genotípusának megoszlása különbözik a ROP miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttek között.

Többszörös logisztikus regresszió segítségével igazoltuk, hogy az eNOS aa homozigóta mutáns genotípus és a ROP kialakulása között összefüggés van.

Az összefüggést korrigáltuk egyaránt nemre, születési korra és az oxigén terápia hosszára, melyek a ROP kialakulásának bizonyított rizikó faktorai.

Nem találtunk ugyanakkor különbséget a mutáns „a” allél frekvenciájában a két csoport között.

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus genotípusainak gyakoriságát vizsgálva nem mutatkozott különbség a ROP miatt kezelt és nem kezelt koraszülöttek között. Nem volt különbség a mutáns T⁻⁷⁸⁶C allél megoszlásában sem a két vizsgálati csoport között.

A 27-bp repeat polimorfizmus funkcionális polimorfizmus, melynek szerepe van az eNOS enzim termelődésének szabályozásában: szoros összefüggést lehet kimutatni az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus jelenléte és a plazma NO metabolitok szintje

között (113,139): az „a” allélt hordozókban szignifikánsan alacsonyabb a NO metabolitok szintje (113).

A ROP első fázisára a születés utáni relatív hiperoxiának kitett retinában meginduló vazo-obliteráció jellemző.

NOS gátlószer alkalmazása patkányokban, illetve az eNOS gén kiütése egerekben csökkenti a megjelenő a hiperoxia következtében kialakult vazo-obliteráció mértékét a retinában (108,109).

A ROP második fázisára a vazo-obliteráció következtében kialakult retinális hipoxiára adott patológiás érújdonképződés, a neovaszkularizáció a jellemző.

Az eNOS közvetíti részben az endotél sejtek egyik legfontosabb mitogén faktorának, a VEGF proangiogenetikus hatását, így központi szerephez jut az angiogenetikus folyamatokban.

Ando és mtsai kimutatták, hogy eNOS knock-out egerekben az iszkémia talaján létrejött retinopátiában szignifikánsan kisebb mértékben zajlik a neovaszkularizáció (140).

Röviden összefoglalva, az elsősorban állatkísérletekből származó eredmények együttesen azt a feltételezést sugallják, hogy az eNOS fokozza a koraszülöttek retinopátiájának patogenezisében megjelenő folyamatok súlyosságát.

Ezzel szemben eredményeink ezzel ellenkező összefüggést mutattak, hiszen a csökkent eNOS termeléssel járó genetikai polimorfizmus azokban a koraszülöttekben volt gyakoribb, akikben kialakult a kezelésre szoruló retinopátia.

Ennek a meglepő eredménynek egyik lehetséges magyarázatául szolgálhat az, hogy Campochiaro vizsgálataiban megfigyelte, hogy alacsony koncentrációban termelődő NO képes megnövelni a VEGF termelődését, majd ezen keresztül fokozza a neoangiogenesis mértékét (141).

Áttekintve az irodalmi adatokat, léteznek olyan megfigyelések is, melyek szerint – ugyan a NO-nak elsődlegesen az angiogenesis fokozásában tulajdonítanak szerepet - a NO meghatározott körülmények között képes gátolni az angiogenesis folyamatát. Egér implantációs, illetve csirke chorio-allantois membrán modellekben sikerült az angiogenesiszt NO donor S-nitroso N-acetil glutationnal gátolni (142).

Hangai és mtsai figyelték meg azt, hogy a konstitutív NOS enzimek együttes gátlása NG-nitro-L-argininnel felnőtt patkányokban csökkenti a retina iszkémiával szembeni toleranciáját (143). Zhu és mtsai szerint eNOS knock-out egerekben a retina

iszkémiás prekondicionálása nem fejt ki védő hatást a retina iszkémiás károsodásával szemben (144).

Utóbbi megfigyelések arra utalnak, hogy az eNOS protektív szerepet játszik a retina iszkémiás károsodásának kialakulásával szemben –feltételezhetően- a vazodilatáció fokozásán keresztül.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a ROP első fázisában a hiperoxia által indukált vaso-obliteráció csökkent mértékben zajlik azokban a koraszülöttekben, akikben az eNOS a normál szintnek megfelelően működik a mutáns 27-bp repeat „a” allélt hordozókkal szemben. Ez magyarázatául szolgálhat annak, hogy vizsgálatainkban miért figyeltük meg a csökkent NO szinttel járó polimorfizmus gyakoribb előfordulását ROP miatt kezelt kissúlyú koraszülöttekben. Campochiaro és mtsai-nak eredményei alapján szintén feltételezzük, hogy a mutáns allél miatt a fiziológiásnál alacsonyabb koncentrációban termelődő NO a VEGF szintézisének emelésén keresztül fokozott neovaszkulogenezist indukál a ROP második fázisában a polimorfizmust hordozó koraszülöttek retinájában. Ahhoz azonban, hogy ezt a hipotézist bizonyítani tudjuk, a VEGF helyi szintjének detektálására lenne szükség.

10. Eredmények összefoglalása

10.1. A NOS izoformák expressziójának változása vese iszkémia/reperfúziós károsodás során

1. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a nNOS mRNS expressziója csökken, az iNOS mRNS expressziója emelkedik, az eNOS mRNS expressziója nem változik az iszkémiás inzultust követően 24 órával patkány veseszövetben. Megfigyeltük, hogy az iNOS fehérje expressziója az RNS expresszió változásának megfelelően szintén emelkedik 24 órás reperfúziót követően a vesében. Az eNOS fehérje szintjében szignifikáns csökkenést detektáltunk.
2. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az iszkémiás inzultus kiváltása előtt 7 napig szájon át végzett L-arginin kezelés nem változtatja meg a vese iszkémia/reperfúzió által kiváltott károsodásának mértékét patkány modellben. Vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy az L-arginin kezelés megnövelte mindhárom NOS izoforma (nNOS, iNOS és eNOS) mRNS expresszióját vivóanyag kezelt állatokhoz képest. Az L-arginin kezelés az iNOS fehérje szintézisét megemelte, míg az eNOS esetében fehérje expressziós szinten nem tudtunk változást detektálni.
3. Kísérleteink bebizonyították, hogy a 7-NI szelektív nNOS gátlószerrel az iszkémiás inzultus előtt 7 napon át végzett előkezelés nem befolyásolja a vese I/R károsodás kimenetelét. A 7-NI kezelés csökkentette a nNOS mRNS expresszióját, ugyanakkor nem változtatta meg az iNOS és eNOS mRNS szintézisét a vesében 24 órás reperfúziót követően vivóanyag kezelt állatokhoz képest. A 7-NI kezelés csökkentette az iNOS fehérje expresszióját a vesében az iszkémiát követően 24 órával.

10.2. Az eNOS génpolimorfizmusok és a kis születési súlyú koraszülöttek retinopátiája közötti kapcsolat vizsgálata

4. Munkánk során elsőként tudtuk kimutatni, hogy az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus a kezelést igénylő ROP kialakulásának független rizikófaktora. Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a ROP kialakulása és az eNOS T⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmus között.

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni **Tulassay Tivadar Professzor Úrnak**, hogy az általa vezetett PhD program résztvevője lehettem az I. Sz. Gyermekklinika nefrológiai kutatólaboratóriumában. Hálás vagyok a szakmai és az anyagi háttér biztosításáért, mely folyamatosan lehetővé tette, hogy PhD munkám éveit egy nemzetközi szinten is elismert laboratóriumban tölthessem.

Hálával tartozom témavezetőimnek, **Prof. Reusz Györgynek** és **Dr. Szabó Attilának**, hogy tudományos pályámon elindítottak. Köszönöm nekik, hogy munkám során támogatásukra bármikor számíthattam, és hogy a kutatómunka szakmai és technikai feltételeit megteremtették számomra. Külön köszönettel tartozom Dr. Szabó Attilának a munkatervem kidolgozásában és a kutatómunkám során nyújtott folyamatos metodikai segítségért és hogy megteremtette számomra annak lehetőségét is, hogy számos szakmai konferencián részt vehessek.

Köszönöm **Dr. Vannay Ádámnak**, **Dr. Fekete Andreának** és **Dr. Müller Veronikának**, hogy megtanítottak a kutatómunka lépéseire a molekuláris biológiai metodikák alkalmazásától egészen az eredmények publikálásáig.

Köszönettel tartozom **Dr. Vásárhelyi Barnának**, **Prof. Szabó Andrásnak** és **Prof. Arató Andrásnak** a biztató szavakért, az önzetlen szakmai és emberi segítségéért.

Köszönöm **Dr. Szebeni Beátának** és **Dr. Prókai Ágnesnek**, hogy a tudományos kísérletek elvégzésében, valamint a közlemények publikálásában segítségemre voltak.

Külön köszönöm, **Dr. Vásárhelyi Barnának**, **Dr. Dunai Györgynek** és **Dr. Treszl Andrásnak** a koraszülött beteganyag gyűjtésében és a humán genetikai vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket.

Köszönöm **Dr. Bokodi Gézának**, **Dr. Borgulya Gábornak** elengedhetetlenül fontos támogatásukat a statisztikai elemzésekben.

Köszönöm az I. Sz. Gyermekklinika kutatóinak, **Dr. Bányász Ilonának**, **Dr. Derzbach Lászlónak**, **Dr. Balogh Ádámnak**, **Dr. Kis Évának**, **Sziksz Ernának** és **Dr. Cseprekál Orsolyának**, hogy baráti, segítő társaságukban, mindenkori jó hangulatban végezhettem PhD munkámat.

Köszönöm **Bernáth Móriának** a kitűnő technikai asszisztenciát és hogy önzetlen segítségére mindig számíthattam.

Külön köszönettel tartozom **Prof. Uwe Heemannak és Dr. Jens Lutznak** a lehetőségért, hogy az általuk vezetett kutatólaboratóriumban néhány hónapot tölthettem és külön köszönöm azt a metodikai tudást, amivel a velük végzett közös munka alatt gazdagodhattam.

Végezetül nagyon nagy hálával tartozom szeretett **szüleim, nagyszüleim**, az egész **családom** felé a mindenkori megértésükért, türelmükért és hogy segítségükre mindig számíthattam.

12. Irodalomjegyzék

1. Szabó A, Müller V. A transzplantált vese hosszú távú működését befolyásoló faktorok. *Orv Hetil* 2002; 143(51):2811-19.
2. Hibbs JB Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol*. 1991; 142(7):565-69.
3. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17(1):7-23.
4. Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res*. 1998; 118:3-11.
5. 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.
6. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 285(3):499-508.
7. Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod*. 2004; 70(3):785-96.
8. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res*. 2002; 90(8):866-73.
9. Shaul O, Mironov V, Burssens S, Van Montagu M, Inze D. Two Arabidopsis cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(10):4868-72.
10. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996; 271(37):22810-14.

-
11. Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem.* 1998; 273(46):30249-54.
 12. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem.* 1997; 272(25):15583-86.
 13. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(35):32663-69.
 14. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res.* 2002; 90(8):866-73.
 15. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113(2):147-56.
 16. Süveges Zs, Tory K, Vásárhelyi B, Reusz Gy. A nitrogén-monoxid szintázok genetikája szív- és érrendszeri, valamint vesebetegségekkel összefüggésben. *Hypertonia és Nephrologia* 2001; 5(2):81-84.
 17. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(2):522-26.
 18. Liu ZZ, Cui S, Billiar TR, Dorko K, Halfter W, Geller DA, Michalopoulos G, Beger HG, Albina J, Nussler AK. Effects of hepatocellular mitogens on cytokine-induced nitric oxide synthesis in human hepatocytes. *J Leukoc Biol.* 1996; 60(3):382-28.
 19. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1993; 178(2):605-13.
 20. Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai JC, Hsieh CM, Kourembanas S, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide

-
- synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994; 269(20):14595-600.
- 21 Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997 Dec 1;418(3):291-6.
- 22 Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(12):1609-15.
- 23 Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002; 277(41):38079-86.
24. Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol.* 1997; 12(1):251-61.
25. Bredt DS. Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity. *Cell.* 1998; 94(6):691-94.
26. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature.* 1991; 351(6326):477-79.
27. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science.* 1992; 257(5068):401-03.
28. Cui X, Zhang J, Ma P, Myers DE, Goldberg IG, Sittler KJ, Barb JJ, Munson PJ, Cintron Adel P, McCoy JP, Wang S, Danner RL. cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle. *BMC Genomics.* 2005; 6:151.
29. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest.* 1996; 97(8):1837-43.
30. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F: Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004; 62(6):505-15.
31. Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(3):595-602.
32. Chlichlia K, Peter ME, Rocha M, Scaffidi C, Bucur M, Krammer PH, Schirmacher V, Umansky V. Caspase activation is required for nitric oxide-mediated, CD95 (APO-1/Fas)-dependent and independent apoptosis in human neoplastic lymphoid cells. *Blood.* 1998; 91(11):4311-20.

-
33. Balakirev MYu, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem.* 1997; 246(3):710-18.
 34. Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res.* 1999; 84(1):21-33.
 35. Manderscheid M, Messmer UK, Franzen R, Pfeilschifter J. Regulation of inhibitor of apoptosis expression by nitric oxide and cytokines: relation to apoptosis induction in rat mesangial cells and raw 264.7 macrophages. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(6):1151-63.
 36. Li CQ, Trudel LJ, Wogan GN. Nitric oxide-induced genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells expressing wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(16):10364-69.
 37. Zech B, Köhl R, von Knethen A, Brüne B. Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem J.* 2003; 371:1055-64.
 38. Baylis C, Harton P, Engels K. Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J AM Soc Nephrol* 1990; 1:875-81.
 39. Blantz RC, Munger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 2002; 90:373-78.
 40. AJ Szabo, L Wagner, A Erdely, K Lau, C Baylis. Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury. *Kidney Int* 2003; 64(5):1765-71.
 - 41 Erdely A, Wagner L, Müller V, Szabo A, Baylis C. Protection of Wistar Furth rat from renal disease is associated with maintained renal nitric oxide. *J AM Soc Nephrol* 2003; 14(10):2526-33.
 42. Szabo A, Heemann U. Ischemia/reperfusion and chronic allograft rejection. *Transplant P* 1998; 30:4281-84.
 43. Brezis M, Rosen SN, Epstein FH: The pathophysiological implications of medullary hypoxia. *AM J Kid Dis* 1989; 13:253-58.
 44. Nath KA, Norby SM: Reactive oxygen species and acute renal failure. *AM J Med* 2000; 109:655-78.

-
45. Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A. (1972) The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest*, 51: 118-26.
 46. Summers WK, Jamison RL. (1971) The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest*, 25: 635-43.
 47. Okusa MD The inflammatory cascade in acute renal failure. *Nephron* 2002; 90:133-38.
 48. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S, Granger DN. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol* 1997, 273:1326-32.
 49. Molitoris BA, Marrs J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med* 1999, 106: 583-92.
 50. Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res* 1997, 81: 922-31.
 51. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997, 99: 2682-90.
 52. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 812-16.
 53. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996, 97: 1056-63.
 54. Bonventre JV, Zuk A: Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004; 66: 480-85.
 55. Muller V, Hamar P, Szabo A, Vogelsang M, Philipp T, Heemann U. In vivo migration of lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transpl Int.* 1999; 12: 145-51.
 56. Lieberthal W, Menza SA, Levine JS Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol.* 1998; 274: 315-27.
 57. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of

apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992;140: 831-38.

58. Jiang H, Koubi D, Zhang L, Kuo J, Rodriguez AI, Hunter TJ, Gautam SC, Levine RA. Inhibitors of iNOS protects PC12 cells against the apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett.* 2005; 375: 59-63.

59. Bank N, Kiroycheva M, Ahmed F, Anthony GM, Fabry ME, Nagel RL, Singhal PC. Peroxynitrite formation and apoptosis in transgenic sickle cell mouse kidneys. *Kidney Int.* 1998; 54: 1520-28.

60. Peresleni T, Noiri E, Bahou WF: Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative injury. *AM J Physiol* 1996; 270: 971-77.

61. Vinas JL, Sola A, Genesca M, Alfaro V, Pi F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 992-603.

62. Ling H, Gengaro PE, Edelstein CL. Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from nitric oxide synthase knockout mice. *Kidney Int.* 1998; 53: 1642-46.

63. Ling H, Edelstein C, Gengaro P. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 1999; 277: 383-90.

64. Shah V, Kamath P. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liv Transpl* 2003: 1-11.

65. Giraldez RR, Panda A, Xia Y, Sanders SP, Zweier JL. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem.* 1997; 272: 21420-26.

66. de Frutos, Sanchez de Miguel L, Farre J, Gomez J, Romero J, Marcos-Alberca P, Nunez A, Rico L, Lopez-Farre A. Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor-alpha and during acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37: 800-07.

67. Mount PF, Hill RE, Fraser SA, Levidiotis V, Katsis F, Kemp BE, Power DA. Acute renal ischemia rapidly activates the energy sensor AMPK but does not increase phosphorylation of eNOS-Ser1177. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: 1103-15.

68. Tomé L, Yu L, de Castro I. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1139-45.

-
69. Jerkić M, Varagić J, Jovović D, Radujković-Kuburović G, Nastić-Mirić D, Adanja-Grujić G, Marković-Lipkovski J, Dimitrijević J, Miloradović Z, Vojvodić SB. L-arginine reduces tubular cell injury in acute post-ischaemic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 1398-07
70. Schramm L, Heidbreder E, Schmitt A, Kartenbender K, Zimmermann J, Ling H, Heidland A. Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail*. 1994; 16: 555-69.
71. Raff U, Schneider R, Gambaryan S, Seibold S, Reber M, Vornberger N, Freund R, Schramm L, Wanner C, Galle J. L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiol*. 2005; 101: 39-50.
72. Noguchi S, Kashihara Y, Ikegami Y, Morimoto K, Miyamoto M, Nakao K. Insulin-like growth factor-I ameliorates transient ischemia-induced acute renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 267: 919-26.
73. Campos SB, Ori M, Dórea EL, Seguro AC. Protective effect of L-arginine on hypercholesterolemia-enhanced renal ischemic injury. *Atherosclerosis*. 1999; 143: 327-34.
74. Garcia-Criado FJ, Eleno N, Santos-Benito F. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation* 1998; 66: 982-90.
75. Rodriguez-Pena A, Garcia Criado FJ, Eleno N. Intrarenal administration of molsodamine, a molecule releasing nitric oxide, reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transplant* 2004; 4: 1605-13.
76. Martinez-Mier G, Toledo-Peereyra LH, Bussell S. Nitric oxide diminishes apoptosis and p53 gene expression after renal ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 2000; 70: 1431-37.
77. Yamashita J, Ogata M, Itoh M. Role of nitric oxide in the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 419-27.
78. Yamasowa H, Shimizu S, Inoue T. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effect of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 153-59.
79. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*. 2007; 10: 133-40.

-
80. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1431-38.
81. Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1156-61.
82. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003; 47: 149-61.
83. Damert A, Miquerol L, Gertsenstein M, Risau W, Nagy A. Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development* 2002, 129: 1881-92.
84. Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, Zheng LP, Bauters C, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 1995, 147: 1649-60.
85. Plate KH, Breier G, Risau W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol* 1994, 4: 207-18.
86. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996, 149: 293-305.
87. Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1996; 114(10):1219-28.
88. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 905-9.
89. Donahue ML, Phelps DL, Watkins RH, LoMonaco MB, Horowitz S. Retinal vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression is altered in relation to neovascularization in oxygen induced retinopathy. *Curr Eye Res.* 1996; 15: 175-84.
90. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular

fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1480-87.

91. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 10457-61.

92. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2625-34.

93. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998; 274: 1054-8.

94. Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Caldwell RB. VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256: 192-97.

95. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998; 392: 821-24.

96. Urbich C, Reissner A, Chavakis E, Dernbach E, Haendeler J, Fleming I, Zeiher AM, Kaszkin M, Dimmeler S. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J.* 2002; 16: 706-08.

97. Nagata D, Mogi M, Walsh K. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem.* 2003; 278: 31000-06.

98. Kawasaki K, Smith RS Jr, Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 5726-37.

99. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 1997; 81: 970-76.

-
100. Tamarat R, Silvestre JS, Kubis N, Benessiano J, Duriez M, deGasparo M, Henrion D, Levy BI. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension*. 2002; 39: 830-35.
101. Veltkamp R, Rajapakse N, Robins G, Puskar M, Shimizu K, Busija D. Transient focal ischemia increases endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood vessels. *Stroke*. 2002; 33: 2704-10.
102. Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Förstermann U. Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1993; 24: 2016-21.
103. Ashwal S, Tone B, Tian HR, Cole DJ, Pearce WJ. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1998; 29: 1037-46.
104. Chen LL, Yin H, Huang J. Inhibition of TGF-beta1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis. *Cardiovasc Pathol*. 2007; 16: 221-30.
104. Yu J, deMunck ED, Zhuang Z, Drinane M, Kauser K, Rubanyi GM, Qian HS, Murata T, Escalante B, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 10999-1004.
105. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998; 101: 731-36.
106. Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, Moniz M, Tessmer J, Chilian WM. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation*. 2000; 102: 3098-103.
107. Chen Z, Joshi S, Kauser K, Brooks AR. Knockdown of endothelial NOS by lentivirus-mediated short hairpin RNA in hemangioendothelioma cells increases proliferation and tumor formation. *Nitric Oxide*. 2007; 16: 403-12.
108. Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL, Caldwell RB. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 222-28.
109. Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F Jr, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, Abran D, Hardy P, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. Redox-

dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1885-94.

110. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999; 99: 2864-70.

111. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H, Nakao K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 2629-37.

112. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, Hayaishi-Okano R, Node K, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Hori M. Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia.* 2002; 45: 1594-601.

113. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245: 190-93.

114. Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1-4.

115. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab.* 2000; 70: 241-51.

116. Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Chevalier A, Slama G, Reach G, Selam JL. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med.* 2002; 19: 240-45.

117. Taverna MJ, Elgrably F, Selmi H, Selam JL, Slama G. The T-786C and C774T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms independently affect the onset pattern of severe diabetic retinopathy. *Nitric Oxide.* 2005; 13: 88-92.

-
118. de Syllos RW, Sandrim VC, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. *Nitric Oxide*. 2006; 15: 417-22.
119. Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya M, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2184-90.
120. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, Sundaresan P. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2006; 12: 336-41.
121. Cooke RW, Drury JA, Mountford R, Clark D. Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 1712-25.
122. Vannay A, Dunai G, Banyasz I, Szabo M, Vamos R, Treszl A, Hajdu J, Tulassay T, Vasarhelyi B. Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res*. 2005; 57: 396-98.
123. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Maslinski W, Shapiro M, Strom TB. The intragraft gene activation of markers reflecting T-cell-activation and -cytotoxicity analyzed by quantitative RT-PCR in renal transplantation. *Clin Nephrol*. 1996; 46: 30-33.
124. Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H, Yamashita K, Masuda J, Kobayashi S. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 605-10.
125. Müller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay A, Fekete A, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int*. 2002; 62: 1364-71.
126. Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1993; 24: 1709-16.
127. De Alba J, Cárdenas A, Moro MA, Leza JC, Lorenzo P, Boscá L, Lizasoain I. Down-regulation of neuronal nitric oxide synthase by nitric oxide after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem*. 1999; 72: 248-54.

-
128. Tomé LA, Yu L, de Castro I, Campos SB, Seguro AC. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 1139-45.
129. Wang X, Liang F, Jiao X, Liu L, Bai X, Li M, Zhi J, Liu H. Diverse effects of L-arginine on cardiac function of rats subjected to myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007; 39: 201-07.
130. Werner-Felmayer G, Werner ER, Weiss G, Wachter H. Modulation of nitric oxide synthase activity in intact cells by intracellular tetrahydrobiopterin levels. *Adv Exp Med Biol*. 1993; 338: 309-12.
131. Kosaka H, Yoneyama H, Zhang L, Fujii S, Yamamoto A, Igarashi J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J*. 2003; 17: 636-43.
132. Schneider R, Raff U, Vornberger N, Schmidt M, Freund R, Reber M, Schramm L, Gambaryan S, Wanner C, Schmidt HH, Galle J. L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 2003; 64: 216-25.
133. Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol*. 1993; 108: 296-97.
134. Beierwaltes WH. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. *Am J Physiol*. 1995; 269: 134-9.
135. Brown R, Ollerstam A, Persson AE. Neuronal nitric oxide synthase inhibition sensitizes the tubuloglomerular feedback mechanism after volume expansion. *Kidney Int*. 2004; 65: 1349-56.
- 136 Qu XW, Thaete LG, Rozenfeld RA, Zhu Y, De Plaen IG, Caplan MS, Hsueh W. Tetrahydrobiopterin prevents platelet-activating factor-induced intestinal hypoperfusion and necrosis: Role of neuronal nitric oxide synthase. *Crit Care Med*. 2005; 33: 1050-6.
- 137 Wolff DJ, Gribin BJ. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 311: 300-6.
138. Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Chevalier A, Slama G, Reach G, Selam JL. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med*. 2002; 19: 240-45.

-
139. Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens*. 2005; 19: 233-40.
140. Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P, Campochiaro PA. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol*. 2002; 191: 116-24.
141. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 2000; 184: 301-10.
142. Powell JA, Mohamed SN, Kerr JS, Mousa SA. Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J Cell Biochem*. 2000; 80: 104-14.
- 143 Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, Yoshimura N. Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Feb;40(2):450-8.
144. Zhu Y, Ohlemiller KK, McMahan BK, Park TS, Gidday JM. Constitutive nitric oxide synthase activity is required to trigger ischemic tolerance in mouse retina. *Exp Eye Res*. 2006; 82: 153-63.

A szerző disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

Rusai K, Fekete A, Szebeni B, Vannay A, Bokodi G, Müller V, Vicklicky O, Bloudickova S, Rajnoch J, Heemann U, Reusz Gy, Szabó A, Tulassay T, Szabó AJ. Effect of neuronal nitric oxide synthase inhibition and L-arginine supplementation on renal ischemia/reperfusion injury and renal nitric oxide system. Article accepted for *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Jun 1. [Epub ahead of print] **IF**: 1,78

Rusai K, Vannay A, Szebeni B, Fekete A, Borgulya G, Vasarhelyi B, Tulassay T, Szabo AJ. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T-786C and 27-bp Repeat Gene Polymorphisms in Retinopathy of Prematurity. *Mol Vis*. 2008;14:286-90. **IF**: 2,377

Disszertációtól független publikációk jegyzéke

Rusai K, Huang H, Sayed N, Strobl M, Roos M, Schmaderer C, Heemann U, Lutz J. Administration of Interleukin-1 Receptor Antagonist Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transpl Int*. 2008 ;21: 572-80. **IF**: 2,146

Fekete A, Vannay A, Ver A, **Rusai K**, Muller V, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ. Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291(4): 806-11. **IF**: 4,199

Fekete A, Viklicky O, Hubacek JA, **Rusai K**, Erdei G, Treszl A, Vitko S, Tulassay T, Heemann U, Reusz G, Szabo AJ. Association between heat shock protein 70s and toll-like receptor polymorphisms with long-term renal allograft survival. *Transpl Int*. 2006;19(3):190-6. **IF**: 2,146

Szebeni B, Veres G, Dezsőfi A, **Rusai K**, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of

children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):34-41. **IF:** 2,518

Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, **Rusai K**, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45(2):187-93. **IF:** 1,764

Szebeni B, Szekeres R, **Rusai K**, Vannay A, Veres G, Treszl A, Arató A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42(1):27-31. **IF:** 1,764

Összesített impakt faktor: **18,694**.