

# RIDOTTA BIODISPONIBILITÀ DI OSSIDO NITRICO NELL'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA: UN NUOVO FATTORE DI PROGRESSIONE?

M. Bonomini<sup>1</sup>, V. Sirolli<sup>1</sup>, N. Di Pietro<sup>2</sup>, A. Pandolfi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti - Pescara

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche, Ce.S.I., Fondazione-Università "G. d'Annunzio", Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti - Pescara

## Reduced NO bioavailability in chronic renal failure: a new progression factor?

*Nitric oxide (NO) is a gaseous free radical and an important molecular mediator of many physiologic processes in virtually every organ. NO is produced from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS). This enzyme is expressed as 3 isoforms, all of which have been isolated from the kidney: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), and inducible NOS (iNOS). At present it is very difficult to measure authentic nitric oxide in vivo; a way to circumvent the difficulties is to study the effects of NOS stimulation and subsequent nitric oxide release directly by measurement of the resulting changes in vascular tone.*

*In the kidney and vasculature, NO plays fundamental roles in the control of systemic and intrarenal hemodynamics, the tubuloglomerular feedback response, pressure natriuresis, release of sympathetic neurotransmitters and renin, and tubular solute and water transport.*

*Chronic renal failure (CRF) is a state of NO deficiency secondary to decreased NO production and/or increased bioinactivation of NO by reactive oxygen species. The purpose of this review is to examine the functions of NO in the kidney, and to discuss the effects of NO deficiency in the progression of chronic kidney disease. (G Ital Nefrol 2008; 25: 306-16)*

Conflict of interest: None

### KEY WORDS:

Bioavailability,  
Renal  
hemodynamics,  
Renal function,  
Chronic renal  
failure,  
Nitric oxide,  
Nitric oxide  
synthase

### PAROLE CHIAVE:

Biodisponibilità,  
Emodinamica  
renale,  
Funzione renale,  
Insufficienza  
renale cronica,  
Ossido nitrico,  
Ossido nitrico  
sintasi

### ✉ Indirizzo degli Autori:

Prof. Mario Bonomini  
Istituto di Clinica Nefrologica  
Ospedale Clinicizzato "SS.  
Annunziata"  
Via dei Vestini  
66013 Chieti  
e-mail: m.bonomini@nephro.unich.it

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è emerso un crescente interesse per le ricerche scientifiche dirette a meglio precisare il significato fisiopatologico e clinico del monossido di azoto (comunemente definito Ossido Nitrico, NO). L'NO, originariamente identificato come fattore prodotto dall'endotelio vascolare in grado di indurre vasodilatazione (*endothelial-derived relaxing factor*), oggi è implicato nei complessi meccanismi della funzione renale (effetto natriuretico e diuretico per blocco dei meccanismi neuronali deputati al riassorbimento tubulare di acqua e sodio) ed in particolare nella regolazione dell'emodinamica renale (zona corticale e midollare, pressione di perfusione glomerulo-tubulare).

Tali meccanismi, oltre ad essere molto complessi, sono ancora scarsamente conosciuti. Ciò nonostante,

gli studi clinici e sperimentali in ambito nefrologico confermano l'interesse sull'NO nella problematica dell'insufficienza renale cronica (IRC) (1). Esso, infatti, può agire come fattore di progressione del danno renale ed aumentare il rischio cardiovascolare in condizioni di ridotta biodisponibilità; mentre, in condizioni di adeguata biodisponibilità, l'ossido di azoto dimostra un importante effetto protettivo in grado di rallentare la progressione dell'IRC e ridurre i fattori di rischio renali e cardiovascolari. L'NO, pertanto, può esercitare un effetto nefroprotettivo o nefrotossico a seconda del suo grado di biodisponibilità nel rene.

Queste ipotesi emergenti, di indubbio significato clinico, sono considerate e discusse nel presente studio, dopo una opportuna disamina delle principali proprietà dell'NO e le sue implicazioni sulla funzionalità renale.

## OSSIDO NITRICO

### Caratteristiche generali

L'NO è un gas radicalico che, diversamente dai radicali liberi, non presenta di per sé una peculiare reattività. Ciò risulta dall'essere un intermedio tra l'ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>) e l'azoto molecolare (N<sub>2</sub>). Sebbene queste tre molecole siano tutte caratterizzate da bassa solubilità e facile diffusione cellulare attraverso la membrana e il citoplasma, l'O<sub>2</sub> si caratterizza per essere un forte ossidante, mentre l'azoto molecolare è tra le molecole chimicamente più inerti. L'NO è essenzialmente un ibrido tra le due molecole menzionate. Tale gas presenta un solo elettrone spaiato, che gli permette di legarsi fortemente al ferro nei gruppi eme, evento cruciale per lo svolgersi della sua attività biologica. Analogamente all'ossigeno molecolare, l'NO reagisce rapidamente con i radicali liberi ma, a differenza dell'O<sub>2</sub>, non innesca un processo di ossidazione a cascata. Tale gas non sembra in grado di riparare il danno tissutale da radicali (come è possibile dimostrare con l'acido ascorbico, il tocoferolo e il glutathione), tuttavia è capace di formare prodotti intermedi che esplicano precise attività biologiche e possono essere "rigenerati" dagli anti-ossidanti per attivare i composti di origine. Per tale ragione, lo stress nitrossidativo è talora considerato un fattore con attività anti-ossidante (2).

### Sintesi ed attività biologica

La sintesi di NO viene regolata da un gruppo di enzimi, denominati Ossido Nitrico Sintasi (NOS), che, catalizzando l'ossidazione del substrato L-arginina in L-citrullina, permettono la produzione di una mole di NO ogni due moli di O<sub>2</sub> consumate (3). Le NOS sono gli unici enzimi che richiedono per il loro funzionamento cinque legami contemporanei con cofattori e/o gruppi prostetici: *flavin adenin dinucleotide* (FAD), *flavin mononucleotide* (FMN), eme, tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e Ca<sup>++</sup>-calmodulina (CaM).

A tutt'oggi sono state isolate, purificate e clonate tre distinte isoforme di NOS (identificate come prodotti di tre differenti geni) con proprietà catalitiche e sensibilità agli inibitori isoforma-specifiche.

La NOS neuronale (nNOS, nota anche come NOS di tipo I) è maggiormente espressa nel tessuto neuronale ed è funzionalmente rilevante nel controllo centrale della omeostasi vascolare (4). È stata in origine purificata e clonata da tessuto neuronale ma attualmente è noto che tale isoforma enzimatica ha un'ampia diffusione tissutale ed i suoi livelli di espressione sono particolarmente elevati nel tessuto muscolare striato (5).

La NOS inducibile (iNOS, NOS di tipo II) è stata individuata inizialmente in linee cellulari macrofagiche

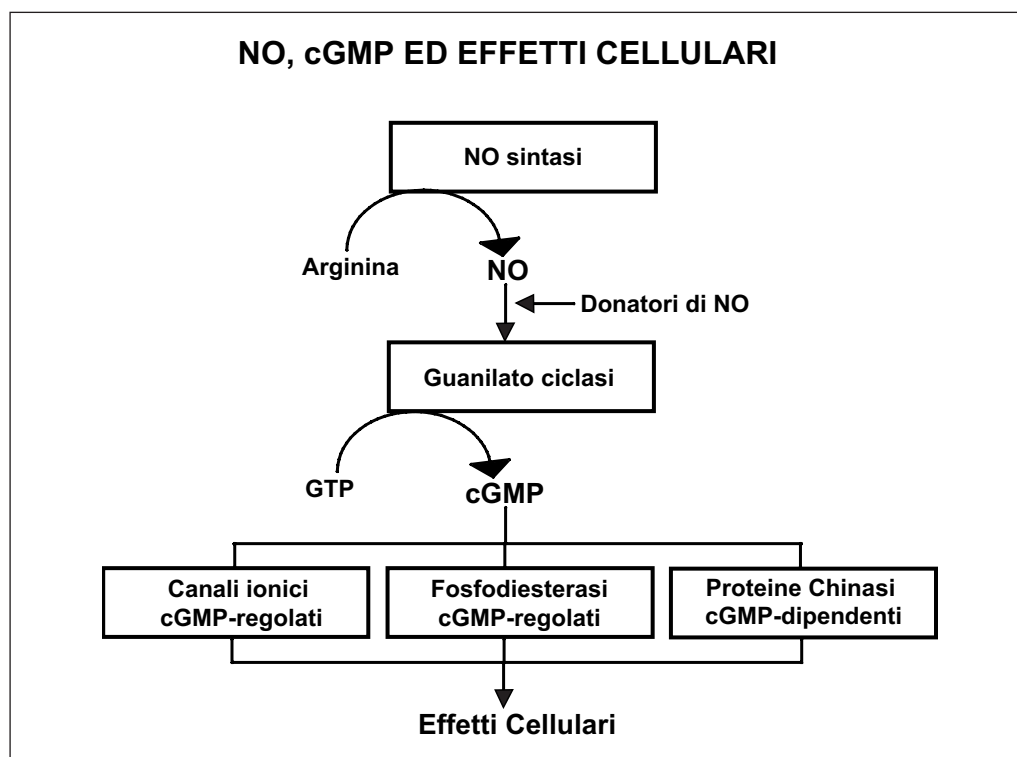
attivate, successivamente in un ampio numero di tessuti e cellule: cardiomiociti, cellule gliali, cellule muscolari lisce, ecc. (5). La sua espressione si evidenzia in situazioni fisiopatologiche peculiari, nell'ambito delle quali i macrofagi esercitano effetti citotossici in risposta ad elevati livelli plasmatici di citochine, ad esempio nella situazione di disfunzione endoteliale (6).

La NOS endoteliale (eNOS, NOS tipo III) è stata l'ultima delle isoforme NOS ad essere identificata nelle cellule endoteliali vascolari. Essa è essenziale per la regolazione del tono vascolare in risposta a vari stimoli, includendo quelli di natura meccanica (ad esempio lo *shear stress*), recettore-mediati (ad esempio dall'acetilcolina) o indipendenti da stimoli recettoriali (ionoforo del calcio). Tale isoforma enzimatica è stata individuata anche nei cardiomiociti, nelle piastrine, nell'area cerebrale dell'ippocampo ed in molti altri tessuti (7, 8).

L'NO è in grado di svolgere il suo ruolo biologico sia nei compartimenti intracellulari che in quelli extracellulari (9). Per questa ragione, l'NO è implicato nella regolazione del "signaling" intracellulare. Nel distretto vascolare l'NO, oltre a rappresentare la molecola chiave nella regolazione della vasodilatazione endotelio-mediata, regola una serie di meccanismi vascolari, quali l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei monociti/macrofagi all'endotelio e la proliferazione/migrazione delle cellule muscolari lisce (10). Inoltre, in ambito neurologico l'NO è coinvolto nella neurotrasmissione, neuromodulazione e plasticità sinaptica (11).

Le funzioni biologiche finora descritte sono attribuibili all'NO prodotto dall'attività delle isoforme NOS così dette "costitutive" (eNOS, nNOS). L'isoforma inducibile (iNOS), la cui espressione è indotta da citochine infiammatorie e/o da stimoli pro-infiammatori, è peculiare dei leucociti macrofagi e neutrofili. La produzione di NO da parte di tali cellule, unitamente all'incremento di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), regola una fondamentale cascata di eventi che fanno parte dei meccanismi intracellulari di difesa immunitaria (12).

L'NO, una volta sintetizzato, diffonde rapidamente negli spazi intercellulari ed attraversa con facilità la membrana cellulare delle cellule bersaglio dove la produzione di GMP ciclico (cGMP) viene regolata dalla guanilato ciclasi (Fig. 1) (13). È noto che tale enzima, presentando lo stesso gruppo eme (protoporfirina IX) dell'emoglobina (14), lega concentrazioni di NO anche molto basse (5-10 nM), che sono comunque sufficienti ad attivarlo ed a promuovere la produzione di cGMP nei tessuti preposti. A sua volta, il cGMP attiva le chinasi cGMP-dipendenti che modulano i livelli intracellulari di calcio influenzando diversi meccanismi cellulari calcio-dipendenti: struttura del citoscheletro, proliferazione cellulare, contrazione muscolare, neurotra-



**Fig. 1** - L'Ossido Nitrico (NO), prodotto a livello endogeno ad opera delle ossido nitrico sintasi o rilasciato da donatori esogeni, attiva la Guanilato Ciclasti (GC) sensibile all'NO. Ciò comporta l'aumento della sintesi di GMP ciclico (cGMP), messaggero intracellulare che regola a sua volta l'attività di chinasi cGMP-dipendenti, di canali ionici cGMP-regolati e di fosfodiesterasi cGMP-regolate. Tali effettori sono coinvolti nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche sia nel sistema cardiovascolare che in quello nervoso.

smissione (13). A differenza di molti agonisti, l'NO, per la sua natura biatomica e gassosa, non può essere facilmente riconosciuto da un recettore. Sono le concentrazioni locali a regolarne gli effetti, così come i livelli di cGMP. È plausibile che i globuli rossi, per le elevate concentrazioni di emoglobina presenti, giochino un ruolo fondamentale nella regolazione della biodisponibilità del gas provvedendo a legare l'NO, soprattutto in situazioni in cui il gas viene prodotto in eccesso (15). Molto di recente, inoltre, è stata dimostrata l'espressione della eNOS negli eritrociti umani, ampliando il ruolo di tali cellule da trasportatori di NO a produttori di tale gas (16).

### Metodi di misurazione

La natura volatile dell'NO, le concentrazioni molto basse (submicromolari) e la diversa reattività chimica di questa molecola in ambiente intra- ed extra-cellulare rendono la sua misurazione molto difficoltosa. Questo spiega l'elevato numero degli approcci sperimentali proposti per valutare in maniera diretta o indiretta l'NO e/o i relativi prodotti stabili di decomposizione.

*In vivo* tale valutazione è ancora oggi estremamente complessa e viene comunque preferita la misurazione indiretta mediante: 1) determinazione dei prodotti stabili di ossidazione dell'NO (nitriti e nitrati); 2) valutazione dei livelli di cGMP; 3) entità della conversione arginina-citrullina (17).

Un metodo utile per accertare la biodisponibilità di NO è la misurazione della risposta vasodilatatoria endotelio-dipendente ad agenti farmacologici o fisici che stimolano la NOS ed il successivo rilascio di NO. Tale valutazione può essere effettuata mediante mezzi diagnostici non invasivi (ultrasonografia ad alta risoluzione) in grado di valutare la dilatazione endotelio-dipendente flusso-mediata dell'arteria brachiale (18). La tecnica si basa sull'aumento dello "shear stress" emodinamico durante iperemia reattiva, quale stimolo al rilascio di NO ed alla conseguente dilatazione endotelio-dipendente dell'arteria brachiale.

### Funzioni dell'Ossido Nitrico nel Rene

Tutte le isoforme dell'enzima NOS sono state localizzate nel rene e possono contribuire alla sintesi di NO nell'organo. La eNOS è presente nelle cellule endoteliali del sistema vascolare renale (19), la nNOS principalmente nelle cellule della macula densa dell'apparato juxtaglomerulare (20), mentre l'espressione della iNOS può essere indotta nelle cellule mesangiali e interstiziali, nei tubuli prossimali e distali e nei nervi intrarenali (21).

L'NO svolge nel rene numerose funzioni (Tab. I) ed ha un importante ruolo nella regolazione del flusso renale ematico, della filtrazione glomerulare e dell'o-meostasi idrosalina.

**TABELLA I - AZIONI DELL'OSSIDO NITRICO NEL RENE**

- Regolazione emodinamica renale e glomerulare
- Regolazione perfusione midollare
- Modulazione *feedback* tubulo-glomerulare
- Mediazione natriuresi pressoria
- Modulazione trasporto tubulare di soluti ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) e acqua
- Interazione con il sistema simpatico renale
- Regolazione funzioni cellulari (proliferazione, trascrizione, metabolismo energetico)

**TEST DI VERIFICA****1) La molecola di Ossido Nitrico è:**

- a. Molecola gassosa con caratteristiche radicaliche
- b. Peptide a basso peso molecolare
- c. Un perossiradicale ad alto potere ossidante
- d. Le risposte b e c sono vere
- e. Le risposte a e b sono false

**2) La biochimica della produzione di Ossido Nitrico necessita:**

- a. Trasformazione di citrullina in arginina mediante trasporto di 7 elettroni da parte di substrati e cofattori.
- b. Trasformazione di arginina in citrullina mediante trasporto di 5 elettroni da parte di substrati e cofattori
- c. Le risposte a e b sono false
- d. Trasformazione di ornitina in citrullina mediante trasporto di 9 elettroni da parte di substrati e cofattori.
- e. La risposta a è vera in condizioni di stress ossidativo intracellulare

**3) Quante e quali sono le isoforme enzimatiche delle NOS che catalizzano la reazione di sintesi di Citrulina ed Ossido Nitrico:**

- a. Sono 2, una costitutiva ed una inducibile (cNOS ed iNOS, rispettivamente)
- b. Sono 3, due costitutive ed una inducibile (nNOS, eNOS ed iNOS, rispettivamente)
- c. Sono 4, tre costitutive ed una inducibile (nNOS, eNOS, mNOS ed iNOS, rispettivamente)
- d. Le risposte b e c sono false
- e. La risposta 3 è vera solo se si riferisce a cellule procariotiche

**4) La Guanilato Ciclasi viene attivata da:**

- a. Aumento delle concentrazioni intracellulari di  $\text{Ca}^{++}$

- b. Aumento delle concentrazioni intracellulari di  $\text{Ca}^{++}$  e di ossido nitrico
- c. Dall'ingresso di ossido nitrico nella cellula
- d. Le risposte a e b sono vere
- e. La risposta c è vera solo in condizioni di stress ossidativo intracellulare

**5) Le isoforme costitutiva della NOS vengono attivate:**

- a. Unicamente dall'aumento delle concentrazioni intracellulari di  $\text{Ca}^{++}$ .
- b. Unicamente dai meccanismi di fosforilazione modulati da chinasi specifiche.
- c. Sia dall'aumento delle concentrazioni intracellulari di  $\text{Ca}^{++}$  che da meccanismi di fosforilazione modulati da chinasi specifiche
- d. Dalle fosfodiesterasi
- e. Dai cambiamenti repentini di pH intracellulare.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

**Effetti sulla microcircolazione renale**

L'NO è un importante modulatore della emodinamica renale e glomerulare (22, 23). In condizioni di normalità, l'NO intrarenale è responsabile fino ad un terzo del flusso ematico nell'organo e contribuisce a mantenerne basse le resistenze vascolari. È stato anche dimostrato che il rilascio di NO regola le resistenze delle arteriole glomerulari afferente ed efferente (24).

Nel microcircolo renale, l'NO svolge un ruolo di critica importanza nella regolazione della perfusione della zona midollare (25-28). La circolazione della midollare renale, oltre alla nota funzione nel sistema di scambio contro-corrente della concentrazione urinaria, riveste importanza nella regolazione del bilancio del sodio e della pressione arteriosa (25). Una riduzione del flusso sanguigno midollare con ritenzione di sodio e ipertensione arteriosa è indotta dall'infusione locale di inibitori della NOS; al contrario, l'infusione negli stessi modelli sperimentali di L-arginina, che incrementa la biodisponibilità di NO, si associa ad un aumento del flusso ematico midollare ed annulla l'innalzamento dei valori pressori (26-28).

L'NO svolge un importante ruolo nell'adattamento renale all'introito salino con la dieta (29), ed è stato osservato che un elevato introito di sale determina un aumento della concentrazione di NO e dell'espressione e attività della NOS, selettivamente confinato alla midollare renale (26-28). Per converso, una ridotta sin-

tesi di NO nella midollare renale è implicata nella patogenesi dell'ipertensione del ratto sodio-sensibile, Dahl (30). È stato anche dimostrato che, in presenza di inibizione intramidollare della NOS, l'infusione di dosi normalmente subpressorie di agenti vasocostrittori come angiotensina II, noradrenalina o vasopressina (che stimolano la sintesi di NO nella midollare renale (25), provoca ipertensione (31). Questi studi suggeriscono che l'NO nella midollare renale potrebbe agire nel controllo dell'escrezione del sodio durante variazioni dell'introito salino e nella contro-regolazione degli effetti di agenti vasocostrittori, allo scopo di mantenere costante il volume ematico e prevenire lo sviluppo di ipertensione arteriosa.

### Effetti sul trasporto tubulare di soluti

L'NO svolge un importante ruolo sul trasporto tubulare di acqua e soluti sia in maniera diretta (32) che mediata, attraverso la regolazione della circolazione e dell'attività nervosa renale.

Le complesse azioni dell'NO a livello del tubulo renale sono state riportate in dettaglio in recenti revisioni (24, 33). Schematicamente, a livello del tubulo prossimale, l'NO inibisce il riassorbimento del sodio mentre stimola il flusso di acqua e  $\text{HCO}_3^-$  e sia la nNOS che la iNOS sembrano partecipare a queste risposte. Nella branca ascendente spessa dell'ansa di Henle, l'NO riduce l'assorbimento di  $\text{NaCl}$  e di  $\text{HCO}_3^-$  mentre stimola l'attività dei canali del potassio. Vi è anche evidenza che a livello del dotto collettore l'NO inibisce l'assorbimento di sodio e la permeabilità osmotica all'acqua stimolata dalla vasopressina. Inoltre, l'NO può inibire l'attività della  $\text{H}^+$ -ATPasi nelle cellule intercalate del dotto collettore e ridurre il trasporto di urea nel dotto collettore midollare interno.

Nell'insieme le evidenze disponibili suggeriscono un effetto inibitorio dell'NO sul trasporto tubulare di sodio con conseguente incremento della natriuresi e diuresi (32).

### Natriuresi pressoria e feedback tubulo-glomerulare

Il controllo a lungo termine della pressione arteriosa viene in parte regolato dal meccanismo della natriuresi pressoria, caratterizzato da un incremento dell'escrezione renale di sodio a seguito di un incremento nella pressione di perfusione del rene. La sintesi di NO sembra in grado di contribuire alla normale risposta natriuretica pressoria. L'inibizione della sintesi renale di NO, infatti, determina uno spostamento verso destra della curva pressione-natriuresi che induce ipertensione arteriosa (34). Inoltre, l'escrezione urinaria dei metaboliti dell'NO aumenta in misura proporzionale alla pressione di perfusione renale (35).

L'attività NOS contribuisce anche al feedback tubulo-

glomerulare, in cui la vasocostrizione dell'arteriola afferente e la risultante riduzione del VFG per singolo nefrone è secondaria ad un aumentato trasporto di soluti al segmento di macula densa del nefrone stesso (36). Un crescente numero di osservazioni suggerisce che l'NO prodotto dalla nNOS presente nella macula densa stimola la guanilato ciclasi solubile, generando cGMP e attivando localmente le *protein kinasi* cGMP-dipendenti che modulano la responsività del feedback tubulo-glomerulare (37). Studi di micropuntura hanno consentito di stabilire che l'effetto dell'NO è quello di antagonizzare la vasocostrizione generata dall'azione del feedback tubulo-glomerulare sull'arteriola afferente (20). Tale azione dell'NO si avrebbe solo durante un introito salino normale o aumentato (38). In particolare, l'NO è importante nel determinare uno spostamento verso destra della curva relativa alla risposta del feedback tubulo-glomerulare (39). Numerosi meccanismi potrebbero regolare la produzione di NO da parte della nNOS presente nella macula densa (38) ma ad oggi mancano evidenze conclusive.

### Interazioni tra l'ossido nitrico e il sistema nervoso simpatico renale

Il sistema nervoso simpatico renale è importante nella regolazione della emodinamica renale e nell'omeostasi del sodio. In differenti condizioni l'NO sembra poter modulare o mediare gli effetti del sistema nervoso simpatico nel rene (33). La sintesi renale basale di NO attenua l'effetto vasocostrittore indotto dalla stimolazione nervosa simpatica nel rene isolato di ratto. È stato anche osservato che la sintesi basale di NO nella midollare renale si oppone alla resistenza offerta da questa area alla vasocostrizione prodotta dall'attivazione del sistema simpatico renale (40). Infine, l'NO media l'aumentato riassorbimento di sodio nel tubulo prossimale stimolato dall'attivazione nervosa simpatica (41).

## OSSIDO NITRICO E INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

### Evidenze e cause di ridotta biodisponibilità

Numerosi studi (42-45) hanno documentato una ridotta escrezione (urinaria e/o nel dialisato) di nitriti e nitrati, prodotti stabili di ossidazione dell'NO, in pazienti con IRC in terapia conservativa sintomatica (42, 43) e in pazienti in trattamento dialitico extracorporeo o peritoneale (44, 45). Risultati sovrapponibili sono stati osservati in numerosi modelli sperimentali di nefropatia cronica (1). Anche la conversione di  $[15 \text{ N}]$ -L-arginina a  $[15 \text{ N}]$ -L-citrullina, mezzo accurato per quantificare la generazione di NO nell'uomo, è risul-



tata ridotta del 50% circa in pazienti affetti da IRC (46). Altri studi tuttavia hanno fornito risultati contraddittori (47), in parte correlabili al protocollo sperimentale impiegato.

La ridotta biodisponibilità di NO nell'IRC è dimostrata da un'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente in pazienti dializzati (48, 49) o in fase pre-dialitica (50-52). Tale alterazione è ritenuta essere specificamente attribuibile ad un'alterazione dell'NO vascolare (53).

Due meccanismi, non mutualmente esclusivi, possono essere all'origine dell'apparente deficit di attività dell'NO nell'IRC: ridotta produzione e/o accelerata degradazione. Le cause proposte sono molteplici ma non ancora definitivamente precisate.

La maggior parte degli Autori ritiene che l'IRC sia caratterizzata da una ridotta produzione di NO. Ciò può risultare dalla presenza in circolo di inibitori dell'enzima NOS come la dimetilarginina asimmetrica (ADMA). L'accumulo di tale inibitore endogeno della eNOS può determinare riduzione del flusso renale plasmatico effettivo e aumento delle resistenze vascolari renali e della pressione arteriosa (54). L'ADMA rappresenta un prodotto del turnover proteico che viene eliminato mediante degradazione ad opera dell'enzima dimetilarginina dimetilaminoidrossilasi (DDAH) e, in minor misura, mediante escrezione renale. Nei pazienti uremici, la concentrazione plasmatica di ADMA è aumentata (55), raggiungendo valori che in volontari sani provocano una riduzione del flusso ematico dell'avambraccio, della perfusione renale, della generazione di NO e dell'escrezione di sodio (56). I livelli circolanti di ADMA nei pazienti in dialisi sono predittivi di mortalità (57) e complicanze cardiovascolari (58).

L'accumulo di ADMA nell'IRC potrebbe essere accentuato anche dall'acidosi, poiché il pH ottimale per l'attività dell'enzima DDAH è 7.4 (59), e, inoltre, si è visto che il pH intracellulare modula anche l'attività degli enzimi nNOS e iNOS (60).

Alcuni polimorfismi genici dell'enzima eNOS sono stati messi in relazione con l'emodinamica e i disordini cardiovascolari (61). In particolare lo studio condotto da Nagase et al. (62), mette in luce che i polimorfismi presenti sull'introne 4 e l'esone 7 del gene per eNOS possono rappresentare fattori di rischio per l'ESRD. I polimorfismi citati, infatti, mediante alterazione dell'attività trascrizionale o post-trascrizionale del gene eNOS, possono influenzare la progressione della malattia renale mediante una diminuita sintesi di NO.

Un ulteriore meccanismo di inibizione della sintesi e funzione di eNOS potrebbe essere rappresentato dall'aumentata capacità di adesione all'endotelio del globulo rosso uremico (63). Recenti studi del nostro grup-

**TABELLA II - PROPONIBILI EFFETTI DELLA RIDOTTA BIODISPONIBILITÀ DI OSSIDO NITRICO IN GRADO DI DANNEGGIARE IL RENE**

*Effetti emodinamici*

- Riduzione flusso renale
- Aumento ritenzione di sodio
- Ipertensione arteriosa sistemica
- Ipertensione glomerulare

*Effetti non emodinamici*

- Aumento crescita mesangio
- Aumentata produzione matrice extracellulare
- Stimolazione geni pro-infiammatori

po hanno dimostrato che l'adesione di eritrociti di pazienti uremici a colture di cellule endoteliali riduce l'espressione e l'attività della eNOS, con conseguente ridotta produzione di NO (64).

Una ridotta biodisponibilità di NO nell'IRC, peraltro, potrebbe anche ritenersi secondaria ad un deficit di substrato o di cofattori essenziali per l'attività enzimatica della NOS (65-67). I livelli ematici di arginina (il substrato della NOS) sono generalmente ridotti nell'IRC, ma la rilevanza clinica di tale alterazione è ancora incerta (65).

Oltre alla ridotta produzione, il deficit di NO nell'IRC può essere dovuto ad aumentata degradazione del radicale gassoso (68). Specie reattive dell'ossigeno come l'anione superossido  $O_2^-$  determinano una prematura inattivazione dell'NO riducendone la biodisponibilità (69). Poiché nell'uremia lo stress ossidativo è aumentato (70), si può ipotizzare che questo possa contribuire alla riduzione dell'NO.

Una ridotta attività dell'NO può anche essere indotta da: 1) un ridotto accesso ai tessuti (come avviene con la deposizione di AGE nel diabete); 2) una ridotta disponibilità di proteine/enzimi bersaglio per l'NO (es. riduzione della guanilato ciclasi solubile); 3) un'alterata trasduzione del segnale (1). Il possibile ruolo di questi meccanismi nell'IRC rimane da valutare.

**TEST DI VERIFICA**

**6) L'NO regola la resistenza a livello:**

- a. Dell'arteriola glomerulare afferente
- b. Dell'arteriola glomerulare efferente
- c. Di entrambe le arteriole glomerulari
- d. Delle arterie interlobari
- e. Di nessuna delle precedenti

**7) A livello tubulare l'Ossido Nitrico:**

- a. Inibisce il riassorbimento di K
- b. Inibisce il riassorbimento di Sodio
- c. Inibisce il riassorbimento di beta2-microglobulina
- d. Inibisce il riassorbimento di cloro
- e. Nessuna delle precedenti

**8) In condizioni fisiologiche l'NO intrarenale è responsabile:**

- a. Della metà del flusso ematico renale
- b. Di 1/3 del flusso ematico renale
- c. Del 25% del flusso ematico renale
- d. Del 75% del flusso ematico renale
- e. Non è possibile fare una quantificazione di tale dato.

**Ridotta biodisponibilità di ossido nitrico e danno renale: osservazioni cliniche**

Una ridotta biodisponibilità di NO può danneggiare il rene sia mediante effetti emodinamici che non emodinamici (Tab. II). Questi ultimi comprendono crescita mesangiale e/o eccessiva produzione di matrice extracellulare (71) e stimolazione della trascrizione di mediatori pro-infiammatori come interleukina-6 e *tumour necrosis factor- $\alpha$*  (72). L'alterata biodisponibilità di NO viene oggi considerata un fattore rilevante nella progressione delle nefropatie (68). Il ruolo nefroprotettivo dell'NO è supportato da studi di genetica molecolare attestanti una maggiore frequenza nei pazienti affetti da ESRD di polimorfismi della eNOS associati ad una ridotta attività dell'enzima (73).

Un possibile ruolo per la ridotta biodisponibilità di NO sulla progressione del danno renale nel paziente affetto da IRC è suggerito da due recenti *trials* clinici osservazionali (74, 75). Peraltro, una valutazione dello *status* dell'NO è possibile solo attraverso la concentrazione plasmatica di ADMA. Pur con i limiti di tale approccio, occorre sottolineare che: 1) le concentrazioni di ADMA riscontrate nei pazienti uremici, significativamente aumentate rispetto ai soggetti normali, sono biologicamente attive *in vitro* (54), *ex vivo* (76) e in volontari sani (77); 2) in cellule endoteliali umane incubate con plasma uremico, l'inibizione della eNOS si correla con i livelli plasmatici di ADMA (76); 3) le sfavorevoli azioni renali dell'ADMA sono riferibili, ad oggi, alla sola azione di inibizione competitiva dell'enzima NOS (78). È pertanto plausibile ritenere che l'aumentata concentrazione plasmatica di ADMA riscontrata nei pazienti nefropatici cronici di entrambi i *trials clinici* (74, 75) potesse essere responsabile di una ridotta biodisponibilità di NO.

Il possibile ruolo dell'ADMA e di vari altri fattori di

progressione del danno renale è stato valutato in 227 pazienti prevalenti non diabetici, relativamente giovani (età media 45 anni), con IRC di grado lieve-moderato (75). Durante il periodo di osservazione di 82 mesi, gli *endpoints* di progressione dello studio, rappresentati da raddoppio della creatinina sierica e/o inizio di terapia dialitica, sono stati raggiunti in 65 pazienti. In questi ultimi la concentrazione plasmatica di ADMA era significativamente più elevata rispetto ai pazienti "non progressors" (n=112). Inoltre, nei pazienti con livelli di ADMA superiori alla mediana (0.44  $\mu\text{mol/L}$ ), la progressione era significativamente più rapida rispetto ai pazienti con valori di ADMA inferiori alla mediana. La concentrazione plasmatica di ADMA è risultata un fattore predittivo indipendente di progressione del danno renale (*odds ratio* 1.47).

Nel *trial* clinico di Ravani et al. (74) sono stati valutati 131 pazienti incidenti, affetti da IRC di grado da lieve a severo (*range* VFG 8-77 mL/min, media 31 mL/min). L'età media dei pazienti era  $71 \pm 11$  anni, ed il 24% di essi era affetto da diabete. In questo studio, è stata osservata una significativa correlazione inversa tra concentrazione plasmatica di ADMA e VFG. Durante il *follow-up* (da 3.4 a 36 mesi, media 27 mesi), 29 pazienti hanno raggiunto la fase terminale dell'IRC e 31 sono deceduti. Il rischio di tali eventi è risultato significativamente ridotto nei pazienti con valori plasmatici di ADMA inferiori alla mediana (0.76  $\mu\text{M/L}$ ) rispetto ai pazienti con valori superiori. L'analisi multivariata ha inoltre evidenziato l'ADMA quale fattore predittivo indipendente di progressione alla fase terminale dell'insufficienza renale e di mortalità (*hazard ratio* 1.203 per ogni 0.1  $\mu\text{M/L}$  di incremento di ADMA nel plasma).

I risultati di questi due studi prospettici suggeriscono che, indipendentemente dall'età e dal grado di insufficienza renale, l'ADMA (e conseguentemente la ridotta biodisponibilità di NO) è coinvolta nella progressione del danno renale.

**Ridotta biodisponibilità di ossido nitrico e danno renale: osservazioni sperimentali**

Nel complesso delle osservazioni sperimentali a tutt'oggi raccolte (studi *in vitro* e nell'animale) sembra giustificato sostenere che il deficit di NO possa svolgere, a livello renale, un ruolo significativo nel favorire l'insorgenza e la progressione del danno renale cronico e dell'ipertensione arteriosa.

L'infusione nel rene di inibitori dell'enzima NOS riduce l'escrezione di sodio e il volume urinario (22) e provoca, inoltre, riduzione del flusso renale ematico midollare e insorgenza di ipertensione sodio-dipendente (79). Nel ratto l'inibizione della NOS indotta dall'infu-

sione di N-nitro-L-arginina metil estere (L-NAME) causa ipertensione arteriosa sistemica e glomerulare, aumento delle resistenze delle arteriole glomerulari afferente ed efferente, riduzione del coefficiente di filtrazione e del VFG per singolo nefrone (80, 81). Risultati ulteriori a distanza di tempo dimostrano in questi animali proteinuria e glomerulosclerosi. Nel modello sperimentale di ipertensione indotta da prolungato deficit di NO, è stata dimostrata un'aumentata attività dell'angiotensina II (l'NO influenza la secrezione di renina) che provoca fibrosi renale a livello vascolare e glomerulare (82). È interessante sottolineare che le alterazioni fibrotiche del suddetto modello possono essere completamente revertite dall'impiego di antagonisti dei recettori AT1 (83).

Nei modelli sperimentali di nefropatia cronica (1) è stata riscontrata una ridotta quantità renale di nNOS. Tale alterazione si associa a ridotta generazione sistemica di NO e diminuita attività renale della NOS *in vitro*, e si correla significativamente con il grado di glomerulosclerosi (84). Che la riduzione della nNOS possa incidere notevolmente nella progressione del danno renale è confermato da altre osservazioni. Mentre in alcuni tipi di ratti (*Sprague-Dawley*, *Wistar*) dopo ablazione/infarto di 5/6 di tessuto renale si verifica una nefropatia progressiva, ciò non avviene nella specie *Wistar Furth*, in cui quantità e attività della nNOS renale sono preservate dopo l'insulto iniziale. Una modesta inibizione cronica della NOS, inoltre, che non ha impatto sulla evoluzione della malattia renale nei ratti *Sprague-Dawley*, provoca nella specie *Wistar Furth* insufficienza renale rapidamente progressiva (85).

Anche la produzione endoteliale di NO da parte della eNOS, distribuita uniformemente a livello vascolare renale, appare importante per l'attività e la funzione renale. Nel modello di insufficienza renale dopo nefrectomia 5/6, caratterizzato da iperfiltrazione nei nefroni residui e aumentata pressione intraglomerulare, il grado di vasodilatazione endotelio (NO)-dipendente delle arterie interlobari al momento della nefrectomia, è risultato essere inversamente correlato al successivo rischio di sviluppo di proteinuria e insufficienza renale (86). La vasodilatazione endotelio-indipendente, al contrario, non si correla con il danno renale, il che suggerisce un meccanismo protettivo di rilascio endoteliale di NO.

Il ruolo nefroprotettivo della eNOS è anche suggerito da recenti osservazioni in nuovi modelli sperimentali di nefropatia diabetica. Rispetto a topi diabetici (ceppo db/db) e topi *knockout* per l'enzima eNOS (eNOS<sup>-/-</sup>), la specie derivante dall'incrocio dei due suddetti modelli (db/db/eNOS<sup>-/-</sup>) è risultata associarsi ad un peggiore "outcome" renale, con più grave aumento dell'albuminuria, più severe e precoci alterazioni morfologiche (ialinosi arteriolare, aumentato

spessore della membrana basale glomerulare, espansione e lisi del mesangio, glomerulosclerosi nodulare) e maggiore riduzione del filtrato glomerulare (87). Risultati simili sono stati osservati nel topo diabetico *knockout* per eNOS (88), dove la predisposizione allo sviluppo di nefropatia diabetica da inibizione della eNOS potrebbe essere legata ad un disaccoppiamento dell'asse NO/VEGF (*vascular endothelial growth factor*), caratterizzato da aumentati livelli di VEGF ed eccessiva proliferazione delle cellule endoteliali VEGF-indotta (88).

## CONCLUSIONI

Dagli studi finora riportati sul potenziale ruolo dell'NO in nefrologia clinica, emergono due possibilità:

- 1) ruolo nefrotossico (insufficiente biodisponibilità di NO);
- 2) ruolo nefroprotettivo (adeguata biodisponibilità di NO).

Nel primo caso la progressione del danno renale verso la ESRD è accelerata e si accompagna a danno vascolare extrarenale con ipertensione arteriosa. Nel secondo caso la progressione del danno renale è rallentata e non si associa ad ipertensione arteriosa.

Questi studi sono ancora prevalentemente sperimentali e osservazioni cliniche nel medio-lungo termine sono necessarie per una migliore definizione dei rapporti NO/funzione renale. Lo studio della duplice azione dell'NO, a seconda del grado di disponibilità, è stimolante e di notevole interesse clinico.

La possibilità di disporre di mezzi diagnostici semplici ed al contempo affidabili per valutare la biodisponibilità di NO, potrà aiutare a definire il ruolo di tale radicale nella malattia renale cronica. Al contempo, appare auspicabile lo sviluppo di misure terapeutiche atte ad antagonizzare in maniera efficace il deficit di NO, ad oggi non ancora disponibili per un uso clinico corrente.

## TEST DI VERIFICA

**9) In base alle evidenze a tutt'oggi acquisite la biodisponibilità di Ossido Nitrico nell'insufficienza renale cronica è:**

- a. Immodificata
- b. Ridotta per riduzione della produzione
- c. Aumentata
- d. Ridotta ma solo nei pazienti in dialisi
- e. Ridotta per riduzione della produzione e/o accelerata degradazione.



**10) In nuovi modelli sperimentali di nefropatia diabetica, la specie derivata dall'incrocio tra topi diabetici e topi knock-out per l'enzima eNOS è risultata associarsi, rispetto alle singole specie di origine, a:**

- a. Maggiore severità proteinuria
- b. Alterazioni morfologiche più severe e precoci
- c. Compromissione filtrazione glomerulare più severa
- d. Tutte le precedenti
- e. Nessuna delle precedenti.

**11) Secondo le evidenze di due recenti trials clinici condotti in pazienti con IRC, è possibile affermare che:**

- a. La biodisponibilità di NO non influenza l'evoluzione delle nefropatie croniche
- b. La ridotta biodisponibilità di NO ha un effetto nefroprotettivo
- c. L'aumentata biodisponibilità di NO ha un effetto nefrotossico
- d. La ridotta biodisponibilità di NO, pur se valutata indirettamente, può favorire la progressione del danno renale
- e. La biodisponibilità di NO andrebbe valutata in tutti i pazienti nefropatici stante la attuale disponibilità di mezzi diagnostici semplici e affidabili per misurare l'ossido nitrico.

## RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato supportato da un cofinanziamento del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (PRIN 2005 a M.B.).

## RIASSUNTO

L'ossido nitrico (NO; monossido di azoto) è un radicale libero gassoso prodotto per azione dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS). Tale enzima presenta tre distinte isoforme: NOS endoteliale, NOS neuronale e NOS inducibile. Tutte le isoforme considerate sono state localizzate nel rene e possono contribuire alla sintesi di NO nell'organo.

La natura volatile della molecola NO ne rende la misurazione molto difficoltosa e ciò spiega l'elevato numero di approcci sperimentali proposti per valutare, in maniera diretta o indiretta, i livelli di NO e/o i relativi prodotti di decomposizione.

Attualmente è noto che tale gas esercita effetti complessi sull'emodinamica renale (zona corticale e midollare, pressione di perfusione glomerulo-tubulare) ed in generale sulla funzione renale (effetto natriuretico e diuretico per blocco dei meccanismi neuronali deputati al riassorbimento tubulare di acqua e sodio).

L'interesse scientifico sul ruolo dell'NO nell'insufficienza renale cronica (IRC) negli ultimi anni è aumentato significativamente permettendo di definire un duplice ruolo di tale molecola. Nel caso di ridotta biodisponibilità esso può essere proposto come fattore di progressione del danno renale e dei fattori di rischio cardiovascolare. Al contrario, in condizioni di adeguata biodisponibilità, l'NO si dimostra una importante molecola protettiva in grado di rallentare la progressione dell'IRC e dei fattori di rischio renali e cardiovascolari.

Tali concetti sono analizzati e discussi nel presente studio dopo un'opportuna disamina delle principali proprietà dell'NO e le sue potenziali azioni sulla funzionalità renale.

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic renal disease. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 123-30.
2. Pacher P, Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
3. Liu Q, Gross SS. Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol* 1996; 268: 311-24.
4. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-54.
5. Michel T, Feron O. Nitric Oxide Synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-52.
6. Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 650-7.
7. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 509-20.
8. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine Rev* 2001; 22: 36-52.
9. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-60.
10. Harrison DG. Nitric oxide and nitric oxide synthases - Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100: 2153-7.
11. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.
12. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biol Med* 2007; 42: 153-64.
13. Jackson EB Jr, Mukhopadhyay S, Tulis DA. Pharmacologic modulators of soluble guanylate cyclase/cyclic guanosine

- monophosphate in the vascular system—from bench top to the bedside. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5: 1-14.
14. Sharma VS, Traylor TG, Gardiner R, Mizukami H. Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 1987; 26: 3837-43.
  15. Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8137-41.
  16. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006; 107: 2943-51.
  17. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *Faseb J* 1993; 7: 349-60.
  18. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-65.
  19. Ujiie K, Yuen J, Hogarth L, et al. Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 267: F296-302.
  20. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11993-7.
  21. Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, et al. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 267: F748-57.
  22. Majid DSA, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 2001; 14: S74-81.
  23. Ito S, Ren Y. Evidence for the role of nitric oxide in macula densa control of glomerular hemodynamics. *J Clin Invest* 1993; 92: 1093-8.
  24. Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol* 2004; 24: 299-315.
  25. Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, et al. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284 (6): 1355-69.
  26. Mattson DL, Lu S, Nakanishi K, et al. Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure. *Am J Physiol* 1994; 266: 1918-26.
  27. Mattson DL, Wu F. Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 149-54.
  28. Mattson DL, Higgins DJ. Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension* 1996; 27: 688-92.
  29. Shultz PJ, Tolins JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest* 1993; 91: 642-50.
  30. Miyata N, Cowley AW Jr. Renal intramedullary infusion of L-arginine prevents reduction of medullary blood flow and hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1999; 33: 446-50.
  31. Szentivanyi M Jr, Maeda CY, Cowley AW Jr. Local renal medullary L-NAME infusion enhances the effect of long term angiotensin II treatment. *Hypertension* 1999; 33: 440-5.
  32. Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol* 2002; 282: F777-84.
  33. Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol* 2006; 187: 433-46.
  34. Salom M, Lahera V, Miranda-Guaridola F, Romero J. Blockade of pressure natriuresis induced by inhibition of renal synthesis of nitric oxide in dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 1992; 262: F718-22.
  35. Suzuki H, Ikenaga H, Hishikawa K, Nakaki T, Kato R, Saruta T. Increases in NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>- excretion in the urine as an indicator of the release of endothelium-derived relaxing factor during elevation of blood pressure. *Clin Sci (Lond)* 1992; 82: 631-4.
  36. Thomson SC, Bachmann S, Bostanjoglo M, et al. Temporal adjustment of the juxtaglomerular apparatus during sustained inhibition of proximal reabsorption. *J Clin Invest* 1999; 104: 1149-58.
  37. Wilcox CS. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 443-9.
  38. Welch WJ, Wilcox CS. Macula densa arginine delivery and uptake in the rat regulates glomerular capillary pressure. Effects of salt intake. *J Clin Invest* 1997; 100: 2235-42.
  39. Schnermann J, Traynor T, Yang T, et al. Tubuloglomerular feedback: new concepts and developments. *Kidney Int Suppl* 1998; 67: S40-5.
  40. Eppel GA, Denton KM, Malpas SC, et al. Nitric oxide in responses of regional kidney perfusion to renal nerve stimulation and renal ischaemia. *Pflugers Arch* 2003; 447: 205-13. Epub 2003 Aug 5.
  41. Wu XC, Johns EJ. Nitric oxide modulation of neurally induced proximal tubular fluid reabsorption in the rat. *Hypertension* 2002; 39: 790-3.
  42. Schmidt RJ, Baylis C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2000; 58: 1261-6.
  43. Blum M, Yachnin T, Wollman Y, et al. Low nitric oxide production in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1998; 79: 265-8.
  44. Schmidt R, Domico J, Samsell L, et al. Indices of activity of the nitric oxide system in patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 228-34.
  45. Schmidt RJ, Yokota S, Tracy TS, Sorkin MI, Baylis C. Nitric oxide production is low in end stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Am J Physiol* 1999; 276: F794-7.
  46. Wever R, Boer P, Hijmering M, et al. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1168-72.
  47. Lau T, Owen W, Yu YM, et al. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest* 2000; 105: 1217-25.
  48. van Guldener C, Lambert J, Janssen MJFM, Donker AJM, Stehouwer CDA. Endothelium-dependent vasodilation and distensibility of large arteries in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 14-8.
  49. van Guldener C, Janssen MJFM, Lambert J, Steyn M, Donker AJM, Stehouwer CDA. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1782-6.
  50. Kari JA, Donald AE, Vallance DT, et al. Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 468-72.
  51. Nakanishi T, Ishigami Y, Otaki Y, et al. Impairment of vascular responses to reactive hyperemia and nitric oxide in chronic renal failure. *Nephron* 2002; 92: 529-35.
  52. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart* 2000; 83: 205-9.
  53. Passauer J, Pistrosch F, Bussemaker E, Lassig G, Herbrig K, Gross P. Reduced agonist-induced endothelium-dependent vasodilation in uremia is attributable to an impairment of vascular nitric oxide. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 959-65.
  54. Kielstein JT, Bode-Bogger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure,

- and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003; 107: 1891-5.
55. Vallance P, Leon A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-5.
  56. Kielstein JT, Tsikas D, Fliser D. Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62 (Suppl. 13): 39-44.
  57. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: A prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113-7.
  58. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62: 339-45.
  59. Knipp M, Braun O, Gehring PM, et al. Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-nitrosylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 3410-6.
  60. Gorren AC, Schrammel A, Schmidt K, Mayer B. Effects of pH on the structure and function of neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J* 1998; 331 (Pt 3): 801-7.
  61. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 921-35.
  62. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, et al. Association of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. *Mol Cell Biochem* 2003; 244: 113-8.
  63. Bonomini M, Sirolli V, Gizzi F, Di Stante S, Grilli A, Felaco M. Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure. *Kidney Int* 2002; 62: 1358-63.
  64. Bonomini M, Pandolfi A, Di Pietro N, et al. Adherence of uremic erythrocytes to vascular endothelium decreases endothelial nitric oxide synthase expression. *Kidney Int* 2005; 67: 1899-906.
  65. Baylis C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 209-20.
  66. Xiao S, Wagner L, Mahaney J, Baylis C. Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F989-95.
  67. Yokoyama K, Tajima M, Yoshida H, et al. Plasma pteridine concentrations in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1032-6.
  68. Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol* 2004; 24: 354-65.
  69. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 72-7.
  70. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Warner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272-80.
  71. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the kidney. *Am J Physiol* 1997; 272: F561-78.
  72. Togashi H, Savaki M, Forman E, et al. Neuronal (type I) nitric oxide-synthase regulates nuclear factor kappa B activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2676-80.
  73. Nori E, Satoh H, Taguchi J, et al. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension* 2002; 40: 535-40.
  74. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2449-55.
  75. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, et al. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2456-61.
  76. Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C. Circulating eNOS inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2001; 59: 1466-72.
  77. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, et al. Cardiovascular effects of systemic NO synthase inhibition with asymmetric dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-7.
  78. Zoccali C, Kielstein JT. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 314-20.
  79. Tian N, Gannon AW, Khalil RA, et al. Mechanisms of salt-sensitive hypertension: role of renal medullary inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 2003; 284: R372-9.
  80. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90: 278-81.
  81. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-64.
  82. Boffa JJ, Tharoux PL, Placier S, Ardaillou R, Dassaule JC, Chatziantoniou C. Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal vasculature of transgenic mice during inhibition of nitric oxide synthesis: Evidence for an endothelin-mediated mechanism. *Circulation* 1999; 100: 1901-8.
  83. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1132-44.
  84. Szabo A, Wagner L, Erdely A, Lau K, Baylis C. Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal function. *Kidney Int* 2003; 74: 1765-71.
  85. Erdely A, Wagner L, Muller V, Szabo A, Baylis C. Protection of Wistar Furth rat from chronic renal disease is associated with maintained renal nitric oxide synthase vs Sprague Dawley. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2526-33.
  86. Gschwend S, Buikema H, Navis G, et al. Endothelial dilatory function predicts individual susceptibility to renal damage in the 5/6 nephrectomized rat. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2909-15.
  87. Zhao HJ, Wang S, Cheng H, et al. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2664-9.
  88. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 539-50.