

Oxidatív stressz szív- és érrendszeri betegségekben és állatkísérletes modellekben

Ph.D. Értekezés

Szerző:
Dr. Seres Leila Bettina



Témavezető: Prof. Dr. Horkay Ferenc Ph.D., D.Sc.

Készítés helye: Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, Budapest, 2006

Program: Az ischaemiás keringési betegségek élettana és klinikuma

A szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Koller Ákos, Ph.D., D.Sc.

Dr. Blázovics Anna Ph.D.

Dr. Székely László Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kónya László Ph.D.

Dr. Lantos János Ph.D.

TARTALOMJEGYZÉK

1

1	BEVEZETÉS	6
1.1	A SZABADGYÖKÖK	6
1.1.1	A SZABADGYÖKÖK EREDETE	6
1.2	ANTIOXIDÁNS RENDSZEREK	8
1.3	AZ OXIDATÍV STRESSZ	11
1.3.1	A POLI (ADP RIBÓZ) POLIMERÁZ ENZIM SZEREPE AZ OXIDATÍV STRESSZ FOLYAMATÁBAN	12
1.3.2	AZ OXIDATÍV STRESSZ KIMUTATÁSA	14
1.3.3	OXIDATÍV STRESSZ ÉS CARDIOVASCULÁRIS MEGBETEGEDÉSEK	17
1.4	A PERICARDIALIS FOLYADÉK VIZSGÁLATA	20
2	CÉLKITŰZÉSEK	22
3	MÓDSZEREK	23
3.1	AZ ANTIOXIDÁNS KAPACITÁS MÉRÉSE SZÍVMŰTÉTRE KERÜLŐ BETEGEKBEN	23
3.2	EGY OXIDÁLT FEHÉRJE SZÁRMAZÉK, AZ ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS (AOPP) MEGHATÁROZÁSA	25
3.2.1	AOPP REFERENCIA TARTOMÁNY MEGHATÁROZÁSA EGÉSZSÉGES ÖNKÉNTESÉKBEN	26
3.2.2	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA KRITIKUS ÁLLAPOTÚ BETEGEKBEN	26
3.2.3	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA SZÍVBETEGEKBEN	26
3.2.4	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA PERIFÉRIÁS ÉRBETEGEKBEN	27
3.3	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLBEN	27
3.3.1	MYOCARDIALIS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA CPB UTÁN PARP INHIBITOR (INO-1001) JELENLÉTÉBEN	29
3.3.2	MESENTERIALIS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA CPB UTÁN PARP INHIBITOR (PJ-34) JELENLÉTÉBEN	29
3.4	STATISZTIKAI ANALÍZIS	30
4	EREDMÉNYEK	32
4.1	AZ ANTIOXIDÁNS KAPACITÁS MÉRÉSE SZÍVMŰTÉTRE KERÜLŐ BETEGEKBEN	32
4.2	OXIDATÍV STRESSZ MÉRÉSE-AOPP MEGHATÁROZÁS	37
4.2.1	AZ AOPP REFERENCIA TARTOMÁNY MEGHATÁROZÁSA	37
4.2.2	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA KRITIKUS ÁLLAPOTÚ BETEGEKBEN	38
4.2.3	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA ACUT CORONARIA SZINDRÓMÁBAN (ACS)	42
4.2.4	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA PERIFÉRIÁS ÉRBETEGEKBEN	44
4.3	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLBEN	46
4.3.1	MYOCARDIÁLIS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA CPB UTÁN PARP INHIBITOR (INO-1001) JELENLÉTÉBEN	46
4.3.2	MESENTERIALIS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA CPB UTÁN PARP INHIBITOR (PJ34) JELENLÉTÉBEN	47

5	MEGBESZÉLÉS	52
5.1	AZ ANTIOXIDÁNS KAPACITÁS MÉRÉSE SZÍVMŰTÉTRE KERÜLŐ BETEGEKBEN	52
5.2	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA KRITIKUS ÁLLAPOTÚ BETEGEKBEN	56
5.3	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA ACUT CORONARIA SZINDRÓMÁBAN	58
5.4	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA PERIFÉRIÁS ÉRBETEGEKBEN	59
5.5	OXIDATÍV STRESSZ VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLBEN	60
5.5.1	MYOCARDIALIS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA CPB UTÁN PARP INHIBITOR (INO-1001) JELENLÉTÉBEN	61
5.5.2	MESENTERIALIS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA CPB UTÁN PARP INHIBITOR (PJ34) JELENLÉTÉBEN	62
6	KÖVETKEZTETÉSEK	65
	MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	66
	ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ - ABSTRACT	67
	IRODALOMJEGYZÉK	68
	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	82
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACE:	angiotenzin konvertáló enzim
ACH:	acetil-kolin
ACS:	acut coronaria szindróma
AGE:	advanced glycation end products
AM:	adrenomedullin
AMI:	acut myocardialis infarctus
ANP:	pitvari nátriuretikus peptid
AOC:	antioxidatív kapacitás
AOPP:	advanced oxidation protein products
ATP:	adenozin-trifoszfát
BNP:	kamrai nátriuretikus peptid
CABG:	koszorúér bypass műtét (coronary artery bypass grafting)
CAD:	coronaria betegség (coronary artery disease)
CBF:	coronaria áramlás (coronary blood flow)
CK:	kreatin-kináz
CNP:	C típusú nátriuretikus peptid
CO:	perctérfogat (cardiac output)
CPB:	cardiopulmonaris bypass műtét
CRP:	C-reaktív protein
Ees:	bal kamrai elaszticitás, a bal kamrai végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés meredeksége
EC:	extracelluláris
ET-1:	endothelin-1
GPO _x :	glutation peroxidáz
GSH:	redukált glutation
GSSG:	oxidált glutation
HPLC:	magas nyomású folyadék kromatográfia (high pressure liquid chromatography)
HR:	szívfrekvencia (heart rate)
hsCRP:	high sensitive C-reaktív protein
IC:	intracelluláris
ICAM:	intracelluláris adhéziós molekula
ImAnOx:	antioxidáns aktivitás, az Immundiagnostic kit márkaneve

LDL: low density lipoprotein
LV +dP/dt: bal kamrai kontraktilitás
LVEDP: bal kamrai végdisztolés nyomás (left ventricular enddiastolic pressure)
LVEF: bal kamrai ejekciós frakció (left ventricular ejection fraction)
LVESP: bal kamrai végszisztolés nyomás (left ventricular endsystolic pressure)
MABP: artériás középnyomás (mean arterial blood pressure)
MDA: malondialdehid
 Δ MÉE: mesenterialis érellenállás változása
NADH: redukált nikotinamid-adenin dinukleotid
NF- κ B: nuclear factor kappa-B
NO: nitrogén monoxid
NYHA: New York Heart Association
PAR: poli (ADP-ribóz)
PARP-1: poli (ADP-ribóz) polimeráz-1
PF: pericardialis folyadék
PRSW: összefüggés a szív munka és a bal kamrai végdiasztolés térfogat között (preload recruitable stroke work)
PTCA: percutan transluminaris coronaria angioplasztika
ROS: oxigén eredetű szabadgyökök (reactive oxygen species)
Se: szérum
SNP: nátrium-nitroprusszid
SOD: szuperoxid dizmutáz
SV: verőtérfogat, (stroke volume)
TAS: teljes antioxidáns kapacitás, (total antioxidant status)
TNF α : Tumor nekrosis faktor alfa
VCAM: vasculáris celluláris adhézións molekula
VHD: billentyűbetegség (valvular heart disease)

1 Bevezetés

1.1 A szabadgyökök

A szabadgyökök egy olyan egy vagy több páratlan elektront tartalmazó molekula, amely igen reaktív, labilis, a páros elektron állapot visszaállítására törekszik, ezért kapcsolatba lép más molekulákkal. Hiányzó elektronja pótlására a szervezetben a környező szövetekből elektront von el, ezzel károsítja a sejtalkotó fehérjéket, a lipideket és a genetikai állományt. A szabadgyökök megsemmisülnek ebben a reakcióban, de a célmolekula szerkezetében maradandó változásokat okoznak.

A szabadgyököknek alapvetően két csoportja van, az oxigén eredetű (ROS- reactive oxygen species) és a nitrogén eredetű szabadgyökök. Oxigén eredetűek a szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$), az aktív hidroxil gyök ($OH^{\bullet}$), a hidroperoxil gyök ($OH_2^{\bullet-}$), a peroxil gyök ($RO_2^{\bullet-}$), az alkoxil gyök ($RO^{\bullet}$), a szinglet oxigén (1O_2) és az ózon (O_3) (Cheeseman KH, Slater TF 1993). A nitrogén eredetű szabadgyökök a nitrogén monoxid szabadgyök ($NO^{\bullet}$), a nitrogén dioxid ($NO_2^{\bullet-}$) és a peroxinitrit ($ONOO^{\bullet}$), alkil peroxinitrit (ROONO) (Gutteridge JMC 1995, Halliwell B, Whiteman M. 2004).

Vannak olyan molekulák is, amelyek nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, mégis reaktívak, képesek kapcsolatba lépni más molekulákkal pl. a hidrogén-peroxid (H_2O_2) vagy a hipoklórsav (HOCl) (Halliwell B, Gutteridge JMC 1986, 1989).

1.1.1 A szabadgyökök eredete

A szabadgyökök az egészséges szervezetben az alapvető anyagcsere folyamatok során keletkeznek folyamatosan az aerob metabolizmus során, speciális enzimek hatására vagy egyéb biokémiai reakciók során (Gutteridge JMC 1995).

Endogén szabadgyökképződés

Szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$) akkor keletkezik, ha az oxigén molekula külső héjára egy elektron kerül, ami létrejöhet nem enzimatis úton, pl. a mitokondriális elektron transzport láncban a szemiubikinonnal való reakció során vagy enzimek közreműködésével (Dröge W. 2002). A nikotinamid adenin dinukleotid (foszfát) NAD(P)H oxidáz és a mitokondrium eredetű szuperoxid gyök adja az érrendszerbe kerülő $O_2^{\bullet-}$ gyök legnagyobb hányadát (Harrison D és mtsai 2003). Az

érsimaizomsejtekben működő NAD(P)H oxidáz szerkezete eltér a fagocitákban található enzimtől (Madamanchi NR és mtsai 2005). Gyulladás során az addig inaktív formában jelen lévő enzim immunglobulinhoz kötött baktériumok, immunkomplexek, complement, leukotriének hatására aktiválódik és ez indítja el a fagocita respirációs burst-t, a szuperoxid gyök kiáramlást (Babior BM. 1984).

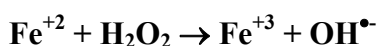
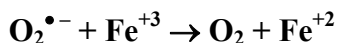
Szuperoxid gyök keletkezik a xantin oxidáz működése során kóros körülmények között és az arachidonsav metabolizmusban a lipoxigenázok hatására (Dröge W. 2002).

A szuperoxid gyök vizes közegben gyorsan átalakul, hidrogén-peroxid (H_2O_2) és víz keletkezik (dizmutációs reakció során), amely reakciót a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim jelentősen felgyorsítja (McCord JM, Fridovich I 1998).

A *hidrogén-peroxid* (H_2O_2) legfontosabb tulajdonsága, hogy hidroxilgyökké alakul fém ionok jelenlétében. Az *aktív hidroxilgyök* ($\text{OH}^\bullet$) a Haber-Weiss reakció során keletkezik szuperoxid anion és hidrogén-peroxid reakciója során:



A vas katalizálta Haber-Weiss reakció vagy Fenton reakció során szuperoxid anion helyett vasion (Fe^{2+}) az elektron donor. Fiziológiás körülmények között a vas transzporterek meggátolják a vas felszabadulását és elérhetőségét a Haber-Weiss reakció katalizálására (Kehrer JP. 2000).



A hidroxilgyök ellen közvetlen enzimes védekezés nincs, ez abból adódik, hogy rendkívül agresszív, reakciósebessége nanosecundum nagyságrendű. A szervezet úgy védekezik a hidroxilgyökök ellen, hogy prekursorát, a hidrogén-peroxidot eliminálja pl a kataláz és a szelén tartalmú glutation peroxidáz segítségével, ezáltal csökkenti a hidroxilgyök képződést.

A *szinglet oxigén* nem szabadgyök, mert nincs párosítatlan elektronja, de a két elektron spinje azonos és így nagy reaktivitású. Fagocita respirációs burst során, vagy enzimatikusan peroxidázok, lipoxigenázok, hidrogén peroxid és hipoklorit vagy peroxinitrit reakciója során keletkezik.

A *nitrogén monoxid* (NO) az endothelialis nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) termeli, kulcsfontosságú az érműködés élettanában. Ha az L-arginin és a tetrahidrobiopterin (THB_4), az eNOS enzim kofaktorai nem állnak megfelelő mennyiségben rendelkezésre,

akkor az enzim szuperoxid aniont termel. Ennek következtében csökken az endothelium függő ér relaxáció, mert az NO reagál a szuperoxid gyökkel és peroxinitrit gyök alakul ki (Madamanchi NR és mtsai 2005). A peroxinitrit hatására lipidek peroxidációja, DNS törése, enzimek és ioncsatornák működésének gátlása, fehérjék oxidálása, nitrálása, a mitokondriális légzés gátlása alakul ki. A peroxinitrit alacsonyabb koncentrációban apoptózis trigger, magasabb koncentrációban nekrozist okoz (Szabó Cs. 2003).

A *hipoklórsav* (HOCl): elsődlegesen baktériumölő hatású, az aktivált polimorfonukleáris sejtekben termelődik, mieloperoxidáz hatására hidrogénperoxid és kloridion reakciója során. A membránokon átjutva fémionok jelenlétében nagy reaktivitású hidroxilgyök képződéshez vezet. Részt vesz a lipid peroxidációban és a DNS károsításban (Schraufstatter IU és mtsai 1990).

Exogén szabadgyökforrások

Fokozottan képződnek szabadgyökök különböző gyógyszerek, antibiotikumok, antineopláziás szerek (bleomycin, adriamycin, doxorubicin (Bruynzeel AM és mtsai 2006), metotrexát, penicillamin, fenilbutazon hatására. A szervezetet érő elektromágneses sugárzás (röntgen, gamma sugárzás (Soloviev AI és mtsai 2003), az UV sugárzás; a dohányzás és anorganikus részecskék (azbeszt, kvarc, szilícium-dioxid), gázok (ózon) belélegzése; valamint toxinok; xenobiotikumok (pesticidek, herbicidek, fémek, kémiai szennyező anyagok) szervezetbe jutása is jelentős szabadgyök képződést indíthat el (Stohs SJ. 1995, Amacher DE. 2006).

1.2 Antioxidáns rendszerek

Tekintve, hogy a szervezetben a szabadgyököknek fiziológias szerepük van a redox szabályozásban, bonyolult védekező rendszer biztosítja, hogy a szabadgyökös reakciók egy bizonyos határig a sejtalkotók károsítása nélkül játszódjanak le. Az antioxidánsok saját elektronjaikat adják át a szabadgyök molekuláknak. Antioxidáns lehet bármely anyag, ami alacsony koncentrációban van jelen összehasonlítva az oxidálható szubsztráttal, és jelentősen késlelteti vagy gátolja a szubsztrát oxidációját (Gutteridge JMC 1995).

Az elsődleges antioxidánsok megakadályozzák új reaktív oxigén szabadgyökök kialakulását. Ebbe a csoportba tartoznak az antioxidáns enzimek: a szuperoxid-dizmutáz

(SOD), kataláz, peroxidázok, glutation-S-transzferáz, reduktázok. Az enzimatisz védekezést kiegészítik a másodlagos antioxidánsok, amelyek a már kialakult gyököket kötik meg, mielőtt beindítanak a láncreakciót, ami sejtkárosodáshoz, és további szabadgyökképződéshez vezet. Ilyenek például az E, az A és a C vitamin, a húgysav, az albumin, a bilirubin, a glutation és a flavonoidok. Amennyiben a szabad gyökök eliminálása nem történik meg, úgy a károsodott molekulák eltakarítása védhet a szekunder szabadgyök-képződéstől, ezáltal gyorsan helyreállhat a sejt, szövet homeosztázisa. E harmadik védelmi vonal képviselői a DNS-, fehérje- és lipid-degradátumokat elimináló repair mechanizmusok.

Az antioxidánsokat megkülönböztethetjük aszerint is, hogy a sejten belül (intracelluláris) vagy a sejtmembránban (membrán) vagy a sejtek közötti térben (extracelluláris) fejtik ki hatásukat (Gutteridge JMC 1995).

Az intracelluláris antioxidánsok

A szuperoxid gyököt a szuperoxid dizmutáz (SOD) hidrogén peroxiddá alakítja, amit a peroxidáz és a kataláz alakít tovább vízzé. Minden aerob szövetben megtalálható. Az SOD-nak két fajtája van: a citoplazmában jelen lévő réz és cink függő, valamint a mitokondriumban található mangán függő enzim (Gutteridge JMC 1995).

A hidrogén peroxid két enzim révén kerül eltávolításra. Ha a H_2O_2 alacsony koncentrációban van jelen, a kataláz, egy 4 NADPH-t és vasat tartalmazó hemoprotein szűri ki, ami a máj, a vese, a vér alakos elemeiben és a sejtekben a peroxisomákban található. A hidrogén peroxidot vízzé és oxigénné alakítja. Ha a H_2O_2 magas koncentrációban van jelen, a szelén függő glutation peroxidáz (GPOx) távolítja el, ami organikus hidroperoxidokat is kiszűr. Működéséhez szükséges a redukált glutation (GSH), ami oxidálódik a peroxidok oxidációjával egyidejűleg, oxidált glutation alakul ki (GSSG), ami a NADPH függő glutation reduktáz (GSSG red) hatására alakul vissza redukált glutationná (Arthur JR. 2000). A glutation központi szerepet játszik az antioxidáns védelemben, a vörösvérsejtekben, a vérlemezkékben, a fehérvérsejtekben fordul elő. A glutation reduktáz szelént tartalmaz, ha csökken a plazma szelén szintje, vagy ha a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz hiányzik, csökken a redukált glutation szintje, így a peroxidok eliminációja is zavart szenved. A vörösvérsejtekben a membránlipidek, és a hemoglobin szabadgyökök elleni védelmében játszik szerepet (Avisar N és mtsai 1989).

A glutation S transzferázok számos endogén és exogén epoxidot, organikus hidroperoxidot, karcinogéneket, mutagéneket, xenobiotikumokat képesek hatástalanítani. A mitokondriumban a koenzim Q és a liponsav, két fontos metabolikus antioxidáns található.

A membrán antioxidánsok: A membránok hidrofób lipid rétegében lipofil szabadgyökök képződnek, amelyek semlegesítését más típusú antioxidánsok végzik.

Az E vitamin (α -tokoferol) a leghatásosabb lánctörő antioxidáns, a membránkomponenseket védi a lipidperoxidációtól és a szabadgyökök mediálta sejten belüli szignáltranszdukciós folyamatokat is gátolja (Chatelain E és mtsai 1993).

Az A vitamin (β karotin) zsírolékony, gyökfogó és szinglet oxigént semlegesítő (Gutteridge JMC 1995).

Extracelluláris (EC) antioxidánsok: A testfolyadékok általában nem tartalmazzák az intracelluláris antioxidánsoknál leírt enzimeket, mindamelllett a glutation peroxidáznak és a SOD-nak van EC formája is. A legfontosabb, hogy a szuperoxid anion és a H_2O_2 ne kerüljön kapcsolatba az EC vassal, vagy rézzel, ezért az EC antioxidánsok a vasat és a rezet nem reaktív formában kötik meg. A transferrin, a laktoferrin vasat köt meg. A haptoglobinok és a hemopexin megkötik a hemoglobint és a hem vasat, ezzel csökkentve azok a lipid peroxidációt fokozó hatását.

A cöruoplazmin egy akut fázis fehérje, a rezet köt meg, ferroxidáz aktivitást is kifejt, ezen kívül reagál a szuperoxid anionnal és a H_2O_2 -dal is.

A plazmában az albumin az egyik legfontosabb EC antioxidáns, molekulánként egy szulfhidril csoportot tartalmaz, önmagában megköti a szabadgyököket. Az albumin a vas és a réz megkötésére is képes. A megkötött fémek a Haber-Weiss reakció számára elérhetőek lesznek, de a képződő aktív hidroxil gyököt az albumin azonnal megköti. A fehérje sérülés biológiailag nem jelentős a rendelkezésre álló albumin magas koncentrációja miatt, és a szabadgyököket azelőtt hatástalanítja, mielőtt azok más életfontosságú fehérjéket károsítanának (Gutteridge JMC 1995).

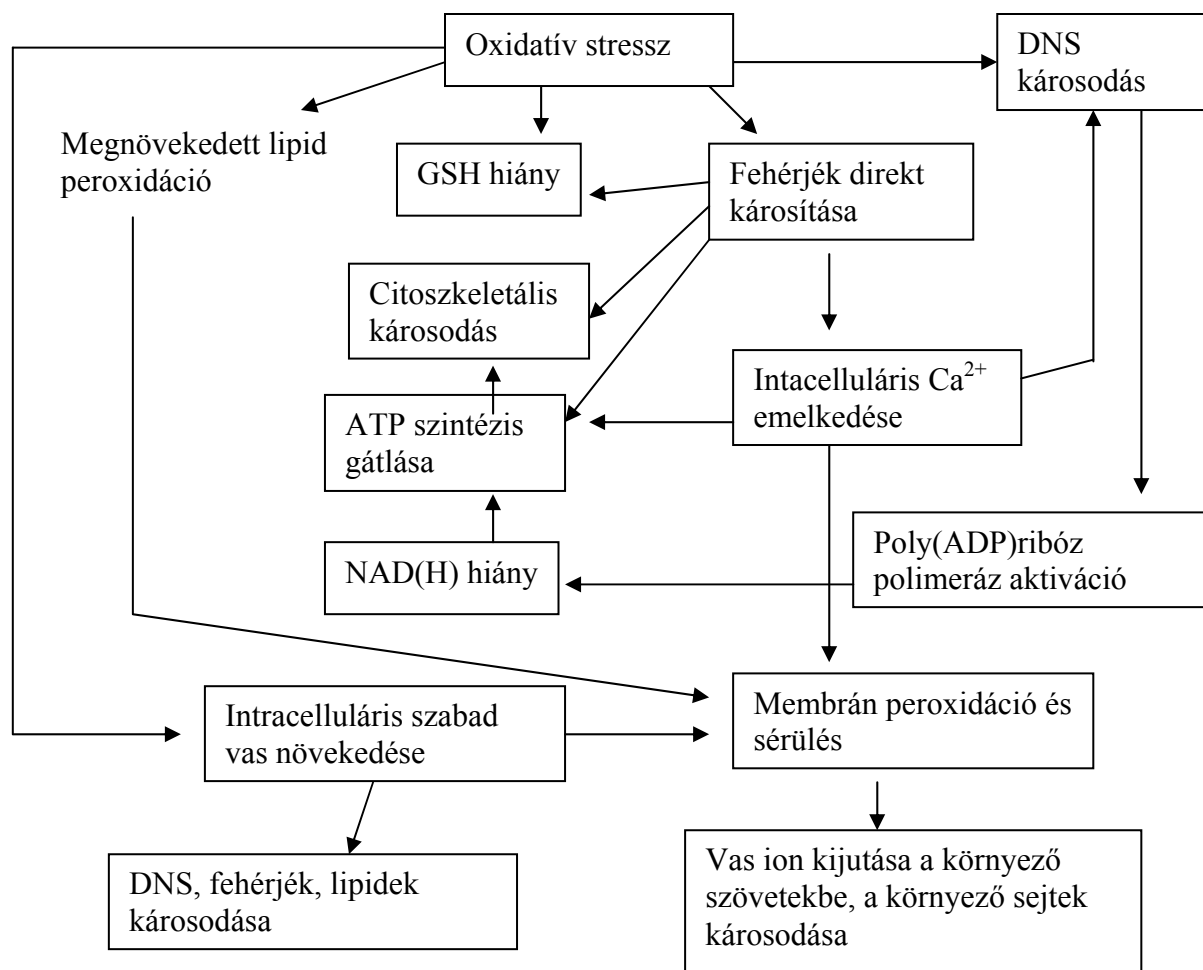
A C vitamin az oxidált glutationt redukálja, emeli a sejt redukált glutation szintjét. A sejt redox homeosztázisában a legfontosabb antioxidáns. A C-vitamin regenerálja az E vitamint, az E vitamin a beta-karotin kémiai kötéseit védi a szabadgyökök okozta oxidációtól (Bulger EM, Helton WS. 1998).

1.3 Az oxidatív stressz

Az oxidatív stressz a reaktív oxigén vagy nitrogén eredetű szabadgyökök keletkezése és az antioxidáns védő rendszerek közötti egyensúly megbomlása, a sejtek oxidoredukciós állapotának megváltozása során lép fel. Az ATP keletkezése során számos oxidációs- redukciós lépés történik, amikor redukáló ágens (hidrogén) szállítódik az oxigénre. A ROS kontrollálatlan keletkezése vagy az antioxidáns rendszer működésének csökkenése vezet az oxidatív stressz kialakulásához. Szinte nincs olyan betegség, ahol a szabadgyökök károsító hatását ne mutatták volna ki, vagy a szabadgyökök túltermelődése vagy az antioxidáns rendszer károsodása miatt. A szabadgyökök képesek arra, hogy az antioxidáns rendszerek működését gátolják, pl. úgy, hogy elfogyasztják a rendelkezésre álló antioxidánsokat, így pozitív visszacsatolós kör alakul ki. A sejtek egy másodlagos oxidatív károsodásra érzékenyebbek lesznek. Az önrontó kör folytatódik, és a sejt károsodása tovább nő egészen akár a sejthalálig (1. ábra).

A sejtpusztulás stressz-indukált ion-deregulációját, vagy szabadgyökös folyamatait, melyet fizikai, kémiai és biológiai változások idéznek elő, el kell választani az apoptózistól, a programozott sejthaláltól, a genetikailag determinált öngyilkos folyamattól, melyek során azonban szabadgyökös mechanizmusok fontos szerepet játszanak (Polyak K. és mtsai 1997).

Az oxidatív stressz szerepét több mint 100 betegségben, számos kórfolyamatban feltételezik, ezek közül pl: atherosclerosis (Harrison D. és mtsai 2003), diabetes mellitus (Haidara MA. és mtsai 2006), Alzheimer-kór (Moreira PI. és mtsai 2005), Parkinson-kór, sclerosis multiplex (Phillis JW és mtsai 2006), gyulladás (Roebuck KA 1999), sepsis (Macdonald J. és mtsai 2003), reperfusios károsodás eseteiben (Marczin N és mtsai 2003), az öregedésben (Linton S és mtsai 2001), az apoptózis folyamatában (Hare JM. 2001) és a xenobiotikumok, toxinok károsító hatásában (Amacher DE. 2006).



1. ábra: Az oxidatív stressz fontosabb hatásai

1.3.1 A poli (ADP ribóz) polimeráz enzim szerepe az oxidatív stressz folyamatában

A poli (ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) a DNS kötő enzimek PARP családjának tagja, más PARP izoenzimekkel együtt, a sejtmagban és a mitokondriumban helyezkedik el számos sejttypusban, a szívizomsejteket is beleértve. A PARP-1 enzim három doménből áll: DNS kötő, automodifikációs és NAD⁺ kötő doménből (Burkle A 2005). Az aktivált PARP a NAD⁺-ot hasítja, nikotinamid és ADP-ribóz jön létre. A PARP ADP-ribózt polimerizál a sejtmagban lévő fehérjékre, hisztonokra, transzkripciósfaktorokra és a PARP enzimre magára. Fiziológias állapotokban a poli (ADP-ribolizáció) szerepet játszik a DNS helyreállításban és a genom stabilitásának megőrzésében, a sejt túlélésében, a sejtosztódásban és differenciálódásban is.

A PARP enzim számos transzkripciós faktor működését is befolyásolja, a nukleáris faktor κ B mediálta transzkripció elősegítésével, aminek központi szerepe van pl. a gyulladásos citokinek, kemokinek, adhézións molekulák, gyulladásos mediátorok expressziójában (Szabó G és mtsai 2004a, Virag L, Szabo C 2002).

A PARP túlaktivációja a sejt túlélését veszélyezteti, mert a sejt NAD^+ raktárait elfogyasztja, a célfehérjéken az ADP-ribóz láncot meghosszabbítja. Mivel a NAD^+ jelenléte a mitokondriális elektron transzportoz elengedhetetlen, a NAD^+ elhasználásával a következményes ATP hiány sejthalálhoz vezet. Az oxigén és nitrogén szabadgyökök és a sejtmagon belüli Ca^{2+} felhalmozódás megnöveli a PARP aktivitását.

A DNS egyes szál törés elengedhetetlenül szükséges elindítója a PARP aktivációnak. A peroxinitrit egy labilis, toxikus molekula, ami a szuperoxid és a nitrogén monoxid reakciója során jön létre. A peroxinitrit és az aktív hidroxilgyök felelős a DNS egyes szál törésért. Környezeti toxikus anyagok, genotoxikus, vagy citotoxikus drogok és az ionizáló sugárzás, valamint nitrogén-monoxid és szuperoxid anion keletkezésével járó folyamatok a kiváltói a DNS szál törésnek (Szabo Cs. 2003).

A PARP inhibitorok alkalmazásával és a PARP gén hiányos egerek vizsgálatával kimutatták, hogy a PARP túlműködése számos oxidatív stressz mediálta kórfolyamatban részt vesz: szívizom ischaemia, reperfusios károsodás, gyulladás, diabetes mellitus, diabetes okozta cardiovascularis betegségek, keringési shock, stroke, szívhypertófia, szívelégtelenség, traumás központi idegrendszeri károsodás, arthritis, colitis, allergiás encefalomyelitis és a gyulladás számos más formájában (Virag L, Szabo C 2002)

Ischaemia-reperfusioban pathofiziológiás kaszkád indul el, gyulladásos válasz alakul ki, a citokinek és a ROS termelődése nő. Az iszkémiás prekondicionálás során a nitroztatív és oxidatív stressz szintje alacsonyabb lesz, ami a prekondicionálás ideje alatt egy kisebb mértékű PARP aktivációt hoz létre. A PARP autoribozilációja a PARP gátlását okozza, és ez lehet az oka annak, hogy elmarad az ischaemia-reperfusio során jelentkező nagy mértékű PARP aktiváció, ami a nem prekondicionált szívben jelentkezik. (Liaudet L és mtsai 2001).

1.3.2 Az oxidatív stressz kimutatása

Az oxidatív stresszt vizsgálhatjuk közvetett módon, a védelem oldaláról, az antioxidáns hatású komponensek mérésével vagy a támadás oldaláról közvetlenül az oxidált metabolitok mérése révén, vagy a két módszer kombinációjával (Del Rio D. és mtsai 2002).

Számos in vitro meghatározás áll rendelkezésre a reaktív oxigén vagy nitrogén gyökök kimutatására. A reaktív oxigén és nitrogén gyökök in vitro elektron spin rezonanciával (ami a párosítatlan elektront detektálja) vagy kemilumineszcenciával mérhetőek, de ezeknek a direkt módszereknek a laboratóriumi alkalmazása nehézségekbe ütközik a módszerek költségessége, valamint a szabadgyökök instabilitása miatt. A szabadgyökök reaktívak, féléletidejük igen rövid, ezért rutin célból történő közvetlen mérésük általában nem végezhető a szövetekben, sejtekben és testfolyadékokban. A szabadgyökökkel történő reakció során átalakult molekulák számos esetben sokkal stabilabbak, mint maguk a szabadgyökök, így pl. a stabil metabolitjaik (nitrát, nitrit) vagy a károsított lipid, fehérje vagy nukleinsav termékek mutathatók ki nagyobb biztonsággal. (Zweier JL és mtsai 1987, Dalle-Donne I. és mtsai 2006)

A sejtmembránokat alkotó lipidek peroxidálódása káros folyamat, mert ennek következménye a membrán átjárhatóságának növekedése, a membránhoz kötött receptorok, enzimek inaktiválódása és így a sejtintegritás károsodása (Gutteridge JM. 1995). A lipid peroxidokat sokszor alkalmazzák az oxidatív stressz biomarkereként, így pl. a malondialdehidet (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal, az izoprosztánokat. Ezek a termékek másodlagos citotoxikus messengerként ott is maradnak a szövetekben, és további károsodásokat idézhetnek elő (Dalle-Donne I és mtsai 2006).

Az izoprosztánok mérése a plazmában és a vizeletben a legkevésbé invazív ex vivo módszer az oxidatív stressz mérésére betegeken (Mallat Z és mtsai 1998, Sakamoto H és mtsai 2002). Az izoprosztánok nem-enzimatis úton keletkezett lipidperoxidációs termékek. Arachidonsavból, eikozapentaénsavból, dodekahexaénsavból, LDL-ből a foszfolipázok hasítják le, majd ürülnek a szabad izoprosztánok (8-izo-PGF₂α) a vizelettel (Morrow JD 1990, 2005).

A fehérjék kötik meg a képződött szabadgyökök 50-75%-át (DE Zwart LL és mtsai 1999). A fehérjék jelentős része elveszti biológiai funkcióját az oxidálódás következtében, az enzim és kötő aktivitás csökken, aggregálódnak, proteolízis indul el,

károsodnak más molekulák, pl. DNS repair enzimek inaktiválása (Dalle-Donne I és mtsai 2006).

Minden aminosav képes oxidálódni, a legérzékenyebbek az aromás aminosavak (fenilalanin, tirozin, triptofán, hisztidin) és a kéntartalmú aminosavak: a ciszteincisztinné alakulhat (tioredoxin reduktáz visszaalakítja), a metioninból metionin szulfoxid lesz, amit a metionin szulfoxid reduktáz alakít vissza (Dean RT és mtsai 1997).

Amikor a szabadgyökök a sejt DNS-hez kapcsolódnak, a DNS kettős spirál kigöngyölödik, bázispárok hibás leolvasása jöhet létre. Mutagén, teratogén, carcinogén hatásuk van. DNS-fehérje keresztkötések alakulnak ki, a DNS vázban törés jön létre, a dezoxiribóz-foszfát váz valamint a purin-pirimidin váz károsodik, a bázisok szabaddá válnak. Az oxidált nukleinsav származékokat (pl. 8 hidroxil 20 deoxi-guanozin) a következő laboratóriumi módszerekkel lehet kimutatni: pl. HPLC, gázkromatográfia, tömegspektrometria, folyadékkromatográfia, tandem tömegspektrometria. Az oxidált és a nem oxidált nukleinsavak koncentrációja között 6 nagyságrend a különbség (Del Rio D és mtsai 2002).

Számos oxidatív stresszt mérő biomarker alkalmazását a klinikai gyakorlatban behatárolja, hogy 1. limitált a specificitása az oxidatív/nitrozatív stressz termékek kimutatására, 2. amit mérünk, az nem a szabadgyökök specifikus produktuma, 3. az egészséges egyéneknél mért termék alacsony koncentrációjára nem kellően érzékeny, 4. a mért változót más külső tényezők is befolyásolják, pl. a táplálékkal felvett zsírok mennyisége, 5. a meghatározás túl invazív az emberi mérésekhez (Dalle-Donne I. és mtsai 2006).

Milyen legyen az ideális oxidatív stressz biomarker? 1. Rendelkezzék magas specificitással a vizsgált hatást illetően. 2. Korai hatást is jelezzon. 3. A nyugalmi szint legyen alacsony. 4. A változás legyen arányos a károsodás mértékével. 5. Viszonylag gyors változásokat is legyen képes követni. 6. Legyen könnyen, gyorsan, olcsón kivitelezhető és lehetőleg automatizált (Halliwell B, Whiteman M. 2004).

1.3.2.1 Advanced oxidation protein products (AOPP)

1996-ban egy új oxidatív stressz biomarkert azonosítottak advanced oxidation protein products (AOPP) néven először krónikusan dializált urémiás betegek plazmájában (Witko-Sarsat V és mtsai 1996). Céljuk volt, hogy meghatározzák az oxidatív stressz okozta fehérje károsodás fokát urémiás betegek és hemodializált krónikus vesebetegek plazmájában. Megfigyelték, hogy az AOPP plazma szintek szoros összefüggést mutattak a plazmában mért ditirozinnal, ami az oxidált fehérjék egyik fajtája és a pentozidinnel, azzal a markerrel, ami a fehérjék glikációját jelzi oxidatív stressz jelenléte esetén, viszont nem mutattak összefüggést a tiobarbitursav reaktív anyagokkal. Az AOPP szintek a kreatinin szintekkel is szoros összefüggést mutattak, a krónikus veseelégtelenség fennállása esetén az AOPP a betegség progresszióját is jelzi (Witko-Sarsat V. és mtsai 1996).

Az AOPP mérőmódszer elve, hogy in vitro körülmények között savas közegben a hozzáadott jódd beépül a mintákban jelen lévő tirozin származékokba (ditirozin, pentozidin és karbonil) és ezáltal jelentősen nő a fényelnyelés 340 nm-en (Capeillere-Blandin C. és mtsai 2004).

Az aktivált monocitákból a mieloperoxidáz aktivitás hatására felszabaduló hipoklórsav adja az AOPP képződésének egy lehetséges módját (Capeillere-Blandin C. és mtsai 2004). Az aktivált fagociták a reaktív szabadgyökök legfőbb forrásai, amelyek az immunvédekezésben játszanak kulcsfontosságú szerepet. A neutrofilek tartalmazzák a hem-oxigenázt, ami a hidrogén-peroxid és a klorid ion reakcióját katalizálja, és hipoklórsav jön létre. HOCl-módosított fehérjéket találtak atherosclerotikus léziókban (Brasen JH és mtsai 2003) és a plazmában glomerulonephritisben (Grone HJ és mtsai 2002). A HOCl kezelt humán szérum albumin és az AOPP in vitro oxidatív burst-t indukált neutrofilekből és makrofágokból, ez azt mutatja, hogy gyulladásos mediátorként működnek (Witko-Sarsat V és mtsai 1998). Aktiválta a NADPH oxidázt és a mieloperoxidázt. Az N-acetilcisztein meggátolta ezt a folyamatot (Witko-Sarsat V és mtsai 2003.)

Emelkedett AOPP plazma szinteket mutattak ki a következő megbetegedésekben: HIV pozitív betegekben a monocita aktivációval arányosan (Witko-Sarsat V. és mtsai 1996),

hipoxiás koraszülöttekben (Bounocore G. és mtsai 2000), továbbá diabetes mellitus 1. és 2. típusában (Kalousova M. és mtsai 2002, Martin-Gallan P. és mtsai 2003), koszorúérbetegségben (Kaneda H. és mtsai 2002), szisztémás szklerózisban (Allanore Y. és mtsai 2004), izomdisztrófiában (Siciliano G. és mtsai 2005), és preeclampsziában (Fialova L. és mtsai 2004).

Az AOPP koncentráció pozitív korrelációt mutatott a szérum húgysav és triglicerid szintekkel, de negatívan korrelált a páciensek életkorával, míg a szérum albumin és az összfehérje csökkent az életkor növekedésével (Matteucci E és mtsai 2001). Összefüggést találtak az AOPP és a szérum triglicerid és koleszterin szintek között (Kalousová M és mtsai 2002). Az AOPP-nek szerepe lehet az oxidált LDL kialakulásában, ami azután az atherosclerosis kialakulásához vezethet (Witko-Sarsat V és mtsai 1996).

Az AOPP szerkezeti és biológiai hasonlóságot mutat az AGE-fehérjékkel (advanced glycation end products): gyulladást kiváltó citokineket és adhézións molekulákat aktivál (Kalousová M és mtsai 2002). Az AOPP-t, mint oxidált fehérje származékot, a szerzők az albuminnal azonosították. A munkacsoportunk kutatási eredményei alapján az AOPP-reakív csoportok a fibrinogénen helyezkednek el. A fibrinogén az atherosclerotikus plakkban antioxidáns hatású, hasítja a fenoxil gyököt (Abudu N. és mtsai 2006)

1.3.3 Oxidatív stressz és cardiovascularis megbetegedések

A cardiovascularis betegségek jelentős hányadában kialakulásuk hátterében az atherosclerosis és a hypertensio áll. Ezekben a kórfolyamatokban fontos szerepe van a szabadgyököknek, mint ahogy a szív-és érrendszeri betegség rizikófaktorai (diabetes, elhízás, dohányzás) is fokozott szabadgyök képződéssel járnak. Számos tanulmány foglalkozik a cardiovascularis betegségek és az oxidatív stressz kapcsolatával pl. érelmeszesedésben (Harrison D és mtsai 2003), akut és krónikus koszorúér szindrómákban (Valgimigli M és mtsai 2003), hypertensióban (Taniyama Y, Griendling KKP 2003, Salska A és mtsai 2005), szívelégtelenségben (Berry CE, Hare JM 2004,

Ferrari R és mtsai 2004), diabetes szívszövődményeiben (Pennathur S, Heinecke JW 2004), érkárosodásban krónikus veseelégtelenségben (Himmelfarb J és mtsai 2002)

Oxidatív stressz és atherosclerosis

Az atherosclerosis meghatározó kezdeti lépése az oxidált LDL molekula átjutása az endotheliumon át az érfalba. Ez általában az endothel sérülés helyén következik be, amit okozhat az oxidált LDL molekula maga vagy kémiai hatások, fertőzés. (Madamanchi NR. 2005) Az oxidált LDL kialakulása ROS jelenlétében, megváltoztatja az LDL biológiai tulajdonságait, elősegíti a makrofágokhoz való csatlakozást és az LDL makrofágok általi bekebelezését. A gyulladásos sejtek az érfalba jutnak be, a továbbiakban mieloperoxidázt bocsátanak ki, ami tovább fokozza a ROS termelődését. A subendothelialis mátrix tovább károsodik olyan proteázoktól, amelyeket az ér mediájából odavándorolt simaizomsejtek termelnek. Ez a vándorlás az egyik kulcs eleme az érlelmeszesedésnek. A migrációban szerepet tulajdonítanak a ROS-nak: a vérlemezkékből felszabaduló növekedési faktor kemotaktikus hatását a kataláz túltelelés csökkentette. A gyulladásos sejtek infiltrációja, az ér simaizomsejtek vándorlása, az oxidált LDL lerakódása vezet a zsíros csíkok és az érlelmeszesedő plakkok kialakulásához. A túltermelődött ROS az endothelsejtekben apoptózist indít el és az érlumenben fokozódik a trombóziskészség. A kórosan működő endothelialis sejtek felszínére számos adhéziós molekula helyeződik ki (intracelluláris, vaszkuláris adhéziós molekula-1, ICAM, VCAM), ami növeli a gyulladásos sejtek kötődését.

A malondialdehid és a fehérjék reakcióját figyelték meg érlelmeszesedésben, ami a szívbetegségek és a stroke közös kórokai között szerepel (Dalle-Donne I. és mtsai. 2006). A károsodott, apoptotikus endotheliumhoz kötődő gyulladásos sejtek az endothelium alatti rétegekbe vándorolnak, ahol az LDL kristályok jelenlétében az ér simaizomsejtekkel és fibroblasztokkal együtt beindul az érlelmeszesedés.

A nitrogén-monoxid (NO) szabadgyökök kulcs szerepe van a vazodilatációban. A szuperoxid anion gyorsan reagál az NO-val és peroxinitrit (ONOO⁻) képződik (Halliwell B, Whiteman M. 2004). Az egészséges artéria falban egyensúlyban van az NO és az O₂⁻ képződése, de a megnövekedett oxidatív stressz csökkenti az NO biológiai hozzáférhetőségét. Az érfalban, beleértve az ér endotheliumot, (különösen az atherosclerotikus léziókban) a szuperoxid anion forrásai a sejtek (fibroblasztok, limfociták, fagociták) és enzimek (xantin oxidáz, az endothelialis nitrogén monoxid

szintáz) (Souza HP és mtsai 2003). A NAD(P)H oxidáznak kiemelt szerepe van a O_2^- termelésben és a hypertensio kialakulásában (Zalba G és mtsai 2001). Koleszterindús diéta során kialakult érrelmeszesedés okai között a xantin-oxidáz indukálta oxidatív stresszt írták le (Ohara Y és mtsai 1993)

Az endothelium függő érrelaxáló faktor (nitrogén monoxid NO) érellazító hatása csökkent hypertensioban az NO megnövekedett lebontása miatt (Busse R, Fleming I 1996). Az érrelmeszesedés rizikófaktorai, mint hypertensio, cukorbetegség, dohányzás ROS túlprodukcióval járnak az endothelsejtekben. A nyíróerő növekedésére, a magas vércukorszintre, a TNF α -ra, az angiotenzin II-re adott válasz eredményeként az oxidatív stressz miatt károsodott endothelsejtekben az NO termelődése csökken, és ezért csökken az endothelium függő érrelaxáció is (Taniyama Y, Griendling KKP 2003).

Antioxidánsok szerepe az oxidatív stressz kialakulásának megelőzésében

Az antioxidánsok (pl. szuperoxid dizmutáz) adása részlegesen visszaállította a csökkent endothelium függő relaxációt, az apoptózist és a protrombotikus állapotot is csökkentette. Vizsgálatok igazolták, hogy az N - acetilcisztein gátolta az adhézis molekulák gén expresszióját (Griendling KKP, FitzGerald GAM 2003).

Koszorúérbetegségben antioxidáns (C-vitamin) adása helyreállította a csökkent endothelium függő érrelaxációt (Levin GN és mtsai 1996), de csak akkor, ha az ischaemia-reperfusios károsodás előtt adták be, utána nem védte ki a hatást. A C – vitamin ugyancsak csökkentette az infarctus mértékét (Becker LB 2004). Alacsony antioxidáns szinteket mértek szívbetegek plazmájában (Landmesser U és mtsai 2000, Mayer M 2000, Nojiri S és mtsai 2001, Krijgsman B és mtsai 2002, Hughes K és mtsai 2002).

Szuperoxid dizmutáz génkiütött egérben dilatatív cardiomyopathia és korai halálozás alakult ki (Li Y és mtsai 1995). Iszkémiás szívbetegek pericardialis folyadék F2 sejtenyészetben apoptózist indukált az oxidatív stresszre érzékeny p38 mitogén aktivált protein kináz úton keresztül (Fujita M és mtsai 2001). Újszülött patkányokból izolált szívizomsejt kultúrában apoptózis indukálódott H_2O_2 vagy szuperoxid anion jelenlétében (von Harsdorf R és mtsai 1999). Ha egy glutation peroxidáz génkiütött egeret tettek ki oxidatív stressznek, esetükben a kisebb oxidatív stressz is nagyobb károsodásokat okozott (Fu Y és mtsai 1999). Szívelégtelenségben ROS forrás a sejtben

a mitokondrium, a xantin-oxidáz, a NADPH oxidáz. Szuperoxid anion-képződik az oxigénből víz keletkezés során, aminek hatására megindul a citokróm c kiáramlás a mitokondriumból a citoplazmába. A végső lépés apoptotikus kaszkád beindítása lesz (Hare JM 2001).

Szívelégtelenségben szenvedő betegekben összefüggést találtak a szívelégtelenség klinikai stádiumai és az antioxidánsok és oxidánsok szintje között: A NYHA III. stádiumban lévő betegekben szignifikánsan alacsonyabb A vitamin, E vitamin és lutein szinteket, míg magasabb malondialdehid értékeket mértek, mint a NYHA II. állapotban lévő betegekben (Polidori MC és mtsai 2002).

1.4 A pericardialis folyadék vizsgálata

A szívet körülvevő pericardialis folyadék átlagos mennyisége 20-25 ml, feladata a szív ciklus során a szív mozgásának megkönnyítése a pericardiális zsákban (Mangi AA, Torchiana DF 1993). Lényegében plazma ultrafiltrátum, a mesothel sejtek termelik, viszont összeköttetésben áll a szívizomsejtek intersticiális terével. A szívizomsejtek által termelt kardioaktív anyagok a pericardialis folyadékba is bekerülnek és paracrin módon visszahatnak magukra a szívizomsejtekre. A pericardialis folyadékban egyes vazoaktív anyagok koncentrációja a plazmaszintek többszörösét is meghaladhatja. Szív műtétre kerülő betegekben magas pericardialis endotelin-1 (Horkay F és mtsai 1997), pitvari- és kamrai nátriuretikus peptid (Soós P és mtsai 2002) szinteket mértek a plazmával összehasonlítva. Koszorúér betegek pericardialis folyadékában emelkedett adenzin, inozin koncentrációkat (Fazekas L és mtsai 1999) és ferritin szinteket (Selmeci L és mtsai 2000) mértek. Instabil anginában a PF-ban emelkedett fibroblaszt és ér endothel növekedési faktort mértek, aminek szerepe lehet a kolleterálisok kialakításában (Fujita M és mtsai 1996). Bal kamrai diszfunkciós betegek PF-ában magasabb adrenomedullin szinteket találtak, mint a plazmában, és ez szoros összefüggést mutatott a bal kamrai paraméterekkel (Tambara K és mtsai 2002).

A pericardialis térben fellelhető ágensek egyszersmind a biológiai szabályozás hatótényezői is lehetnek. A pericardialis térbe kívülről bejuttatott vazoaktív anyagok gyorsan hatnak az epicardialis coronaria erekre és egyes más vazoaktív anyagok elválasztására is. A pericardialisan bejuttatott endothelin-1 kamrai ritmuszavarokat

hozott létre kutyákban (Szokodi és mtsai 1998). A pericardialisan adott adénózin, inózin megnövelte a pericardialis endothelin-1 koncentrációt (Nagy A és mtsai 2004).

Az a tény, hogy a pericardialis folyadék összeköttetésben áll a myocardialis interstitialis folyadéktérrel, a biokémiai vizsgálatok számára a myocardium lokális viszonyainak megértése tekintetében nagyobb teret adhat, mint a perifériás plazma.

Az oxidatív stressz szempontjából az izoprosztánokat vizsgálták szívelégtelenségben a pericardialis folyadékban: a 8-izoprosztán (8-izo PGF_{2a}) szintek, a NYHA stádiumok, valamint az echokardiográfiás adatok, és a szívelégtelenség súlyossága között találtak összefüggést (Mallat Z és mtsai 1998).

Acut myocardialis infarctusban szenvedő betegek PF-ában magasabb interleukin-8, matrix metalloproteináz szinteket mértek, mint angina pectorisban szenvedő betegekben (Kameda K és mtsai 2006). Szívelégtelenségben a pericardialis folyadék izoprosztán szintje és mátrix metalloproteináz aktivitása a bal kamrai végdiasztolés és végszisztolés térfogat index-szel mutatott szoros összefüggést (Kameda K és mtsai 2003).

A pericardialis tér antioxidáns kapacitására vonatkozóan nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok.

2 Célkitűzések

- Célul tűztük ki ischaemiás (koszorúérbetegség) és nem ischaemiás szívbetegség (billentyűbetegség) miatt szívműtetre kerülő betegekben az antioxidáns kapacitás mérését a szérumban és a pericardialis folyadékban összehasonlítás céljából, annak ismeretében, hogy a pericardialis folyadék közvetlenebb információkat adhat a myocardium helyi viszonyairól, mint a szérum.
- Célunk volt a fehérjék oxidációján alapuló, oxidatív stressz biomarker, (advanced oxidation protein products, AOPP) referencia értéktartományának felvétele egészséges önkéntes egyetemi hallgatóktól származó plazma mintákban.
- Vizsgáltuk továbbá, hogy a munkacsoportunk által leírt, automatizált AOPP mérési módszer alkalmas-e az intenzív osztályon tartózkodó, kritikus állapotú betegek oxidatív stressz állapotának kimutatására illetve nyomon követésére.
- Acut coronaria szindróma (ACS) diagnózissal felvett, valamint különböző perifériás érbetegségben szenvedő betegekben szintén AOPP meghatározásokat végeztünk az oxidatív stressz állapot megítélésére, még az invazív beavatkozások előtt. Próbáltunk összefüggést keresni a társbetegségek, a szövődmenyes esetek és az oxidatív stressz súlyossága között. .
- Vizsgáltuk, hogy állatkísérletekben (kutya modell) a cardiopulmonalis bypass és a szívmegállás okozta szív ischaemia-reperfusio és a másodlagos gyulladásos szervkárosodás (mesenterialis terület, bél mucosa) kialakulása mennyiben előzhető meg a poli (ADP)ribóz polimeráz enzim gátlószerével (PJ34 vagy INO-1001), ami a szabadgyökök okozta sejtkárosodást a PARP enzim gátlásával védi ki.

3 Módszerek

3.1 Az antioxidáns kapacitás mérése szívműtétre kerülő betegekben

A vizsgálatban összesen 85 beteget vizsgáltunk: szívműtétre került koszorúér- (CAD, n=50: 28 férfi és 22 nő) és billentyűbetegekben (VHD, n=35: 15 férfi és 20 nő), vér és pericardialis folyadék mintát vettünk.

A betegek tervezett szívműtéten estek át a Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézetben, Budapesten. A VHD csoportban kizáró tényező volt a koszorúérfestéssel igazolt szignifikáns (>50%) koszorúérszűkület vagy több eret érintő koszorúérbetegség, vagy a korábbi szívinfarktus (AMI). A CAD csoportból kizártuk azokat, akiknek a műtét előtti egy hónapon belül szívinfarktusuk volt. Azok a betegek, akiknek a szérum C-reaktív protein értéke 10 mg/L fölött volt, szintén kizártuk a vizsgálat mindkét csoportjából.

Mintagyűjtés:

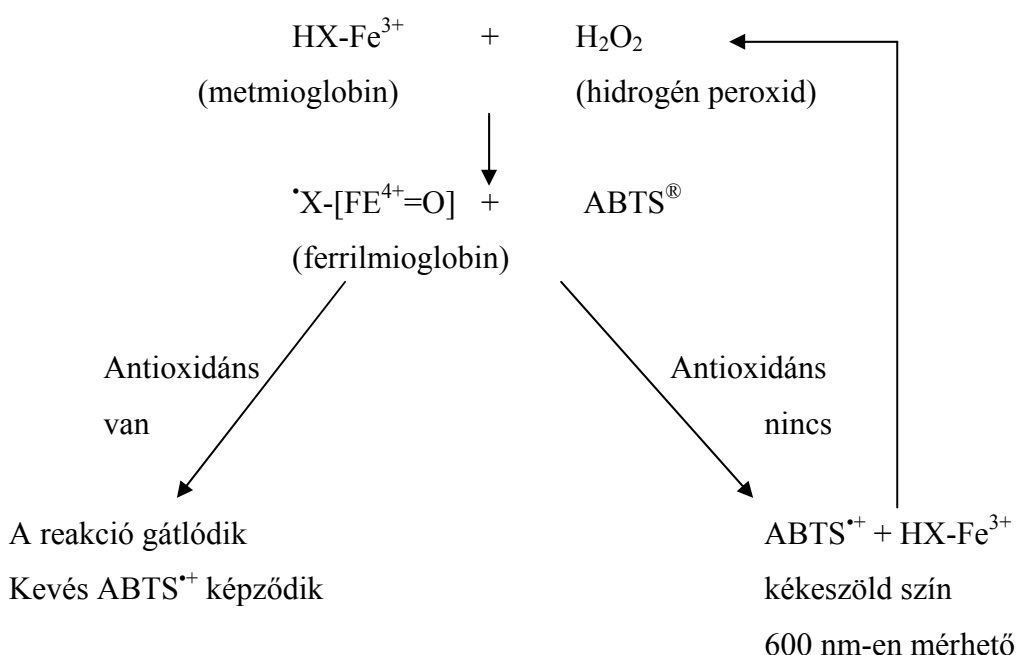
Minden beteget hasonló módon készítették elő a műtétre. Az anesztézia indukciója midazolam, fentanyl; a fenntartása propofol és fentanyl vagy isofluran és fentanyl segítségével történt. A lélegeztetést oxigénnel gazdagított szobai levegővel végezték és a hemoglobin oxigén szaturációját 100%-on tartották, amit folyamatosan ellenőriztek vérgáz monitorozással. Minden beteg medián szternotómián esett át.

A mintavétel a szívműtét során történt. A pericardialis folyadékot a szegycsont átvágása után, amikor a sebész megnyitotta a perikardiumot, fecskendőbe szívtuk le. Ezalatt ügyeltünk arra, hogy vér ne kerüljön a mintákba. A vért a centrális vénás kanülből vettük a pericardialis folyadék vételével egyidejűleg. Ezek a beavatkozások semmilyen többletterhelést nem jelentettek a betegek számára. A mintákat azonnal lecentrifugáltuk (3000 g, 10 perc) és a felülúszót elválasztottuk, és -20 C°-on tároltuk a további vizsgálatig. A hemolitikus vagy véres mintákat nem használtuk fel.

A protein meghatározás a biuret reakció alapján történt, az albumin méréséhez brómkrezol zöldet használtunk, a húgysav enzimatisz kolorimetriás teszttel került meghatározásra. Minden vizsgálathoz Roche reagenst használtunk, a méréseket Cobas Mira Plus klinikai kémiai automata segítségével végeztük.

Minden egyes mintában két egymástól független módszerrel mértük meg az antioxidáns kapacitást (AOC): a teljes antioxidáns aktivitást mérő módszert Miller és mtsai. írták le 1993-ban.

A **TAS** meghatározás elve (Randox): Az $\text{ABTS}^{\text{®}}$ -(2,2'-Azino-di [3-etilbenziazolin szulfonát] peroxidázzal (metmioglobin) való inkubációja során egy radikális kation: ABTS^{*+} jön létre. A reakció kékeszöld szín képződésével jár, amit 600 nm-en lehet leolvasni. A hozzáadott, mérendő mintákban lévő antioxidánsok gátolják a reakciót, így a színeképződést is a koncentrációjuk függvényében (2. ábra).



2. ábra: A TAS meghatározás (Ábra a Randox termékismertetőjéből)

Az ImAnOx (Immundiagnostic, Bensheim, German Republic) mérés elve: A mintában lévő antioxidánsok reakciókészségét határozza meg. Az antioxidáns kapacitás meghatározása a mintában lévő antioxidánsok és a meghatározott mennyiségű exogén hidrogén peroxid (H_2O_2) közötti reakción alapul. A mintában lévő antioxidánsok a hozzáadott H_2O_2 bizonyos hányadát eliminálják. A nem hatástalanított H_2O_2 ezután a tetramethylbenzidinnel reagál. A tetramethylbenzidine (TMB) konverziójával egy színes végtermék képződik. A stop oldat hozzáadása után a minta fényelnyelését 450 nm-en lehet mérni microtiter plate reader (Multiskan Plus MK II, Finland) segítségével.

3.2 Egy oxidált fehérje származék, az Advanced oxidation protein products (AOPP) meghatározása

Az AOPP mérése azon az elven alapul, hogy savas közegben a hozzáadott jód beépül a ditirozin, pentozidin és karbonil csoportokba és nő a fényelnyelés 340 nm-en. Eredetileg mikrolemez módszerként írták le.

A munkacsoportunk a Witko-Sarsat és mtsai. által 1996-ban leírt AOPP mérési módszert automatizálta. Célunk volt egy olyan mérőmódszer beállítása, ami költség hatékonyan, gyorsan, viszonylag nagy számú minta mérésére alkalmas.

A következő vegyszereket használtuk: kloramin-T (N-kloro-p-toluénszulfonamid nátrium só), kálium-jodid (KI) (Sigma-Aldrich Budapest, Hungary), ecetsav (REANAL Budapest, Hungary).

A kloramin-T törzsoldatot (10 mmol/L) 100-szorosára hígítottuk (100 μ mol/L) foszfát pufferben (PBS, 20 mmol/L, pH 7,4). A kalibrációs görbét kloramin-T-re 12,5, 25, 50, 75 és 100 μ mol/L koncentrációkban vettük fel. A kálium-jodidot is PBS-ben oldottuk fel. Az ecetsavat hígítatlanul használtuk (96%, v/v). Az oldatokat 5 °C-on tároltuk. A kloramin-T törzsoldat (10 mmol/L) stabilitása 3-4 hónap volt 5°C-on, a hígított oldatok 3-4 napig voltak eltarthatóak (100 μ mol/L). A plazmát az EDTA-t tartalmazó alvadásgátolt vérből nyertük centrifugálás után (1660 g/10 perc). A vérvétel lila kupakos csövekben történt (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). A plazmamintákat -20 °C-on tároltuk a meghatározásig. Az irodalmi adatok szerint az AOPP stabil maradt -20°C-on és - 80°C-on is 6 hónapig (Matteucci E és mtsai 2001).

A következőkben ismertetjük az AOPP meghatározás lépéseit a munkacsoportunk által automatizált laboratóriumi módszerrel (Cobas Mira Plus): A plazma mintákból 40 μ l térfogathoz a gép 160 μ l PBS puffert adott, keverés és 25 másodperces inkubálás után a keverék abszorbanciáját 340 nm-en olvasta le. Azután 20 μ l ecetsavat adott a keverés és 25 másodperces inkubálás után. Végül 10 μ l KI oldatot adott a reakciókeverékhez, keverés és 25 másodperces inkubáció után az abszorbancia újra leolvasásra került.

Az intra-assay variabilitás (CV) 3,7% volt 22,5 mmol/L, 5,1% volt 36,2 mmol/L és 7,2% volt 62,2 mmol/L (n=12) AOPP koncentráció mellett. Az inter-assay variabilitás 7,1% volt 20,3 mmol/L, 10,5% volt 32,9 mmol/L, és 3,6% volt 59,6 mmol/L mellett

(n=12). Azokban az esetekben hígítottuk a plazma mintákat, amikor a mérési tartományon kívüli ($>100\ \mu\text{l}$) volt az AOPP koncentráció.

3.2.1 Az AOPP referencia tartomány meghatározása egészséges önkéntesekben

266 egészséges önkéntestől (egyetemi hallgatók átlagéletkor 21,3 év (18-33 év), 81 férfi, 185 nő) vettünk vért a könyökvénából.

3.2.2 Oxidatív stressz vizsgálata kritikus állapotú betegekben

A kritikus állapotban lévő, intenzív osztályos kezelést igénylő betegeket (szívtranszplantáció, elektív aorta aneurizma műtét vagy akut aneurizma ruptura eseteit, alsó végtagi elzáródás műtete utáni ischaemia-reperfusio, sepsis, stroke) vizsgáltunk. Az intenzív osztályos kezelés során egy-egy beteget követtünk, és naponta vért vettünk a bent tartózkodás alatt, ezekből a mintákból AOPP meghatározás történt.

3.2.3 Oxidatív stressz vizsgálata szívbetegekben

Összesen 156 beteget vizsgáltunk három csoportban: az effort anginás betegek (n=43, 33 férfi/11 nő, átlagéletkor: 63,8 (42-80) év) közé azokat soroltuk, akiknél nyugalmi angina nem jelentkezett, terhelésre jelentkező anginájuk volt a felvételnél, vagy a felvételt megelőző hetekben.

Az instabil angina csoportba (n=23, 14 férfi/9 nő, átlagéletkor 67,9 (49-84) év) azok a betegek kerültek, akiknél az angina tünetei terheléstől függetlenül, nyugalomban jelentkeztek a felvételnél, vagy a felvételt megelőző időszakban.

Az akut myocardialis infarctust (n=90, 62 férfi/28 nő, átlagéletkor 63,4 (22-90) év), elszenvedett betegek közé azokat soroltuk, akik akut angina tüneteivel érkeztek és az EKG-n ST eleváció volt megfigyelhető, valamint a troponin-T szintjük emelkedett volt.

Az akut coronaria szindróma csoportot az instabil angina és az akut myocardialis infarctust elszenvedett betegek együtt alkották.

A beérkezéskor a rutin laboratóriumi vérvétellel egyidejűleg vettünk vért a perifériás vénából. A szérumból albumin, összfehérje, kreatinin, a plazmából AOPP került meghatározásra.

3.2.4 Oxidatív stressz vizsgálata perifériás érbetegekben

Összesen 179 beteget (121 ffi, 58 nő) vontunk be a vizsgálatba. A carotis stenosis csoportba (66 beteg, 42 férfi/24 nő, átlagéletkor 67,1 év (43-88)), a nyaki UH-gal igazolt szignifikáns nyaki verőér szűkület miatt műtétre váró betegek kerültek. Az alsó végtagi érelzáródás csoportba (113 beteg, 79 férfi/ 34 nő, átlagéletkor 65 év (41-88)) kerültek a alsó végtagi érrekonstrukció műtéti megoldására váró betegek. A műtét előtt perifériás vérvétel történt.

3.3 Oxidatív stressz vizsgálata állatkísérletes modellben

Az állatkísérleteket a Heidelbergi Egyetem Szívsebészeti Kísérletes Laboratóriumában végeztük Németországban. Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Ér- és Szívsebészeti Klinika Kísérleti és Kutató Laboratóriumában végeztük. Valamennyi kísérlet a laboratóriumi állatok tartására vonatkozó nemzetközi szabályoknak megfelelően történt (US NIH Publication No. 86-23, revised 1996).

Általános kísérleti protokoll

24 kutyát (foxhound) (ttkg: 25 ± 4) vizsgáltunk. Premedikációként propionylpromazint használtunk, majd az állatokat pentobarbitállal altattunk el (indukció: 15 mg/ttkg azután iv. fenntartó dózis: 0,5 mg/ttkg). Endotracheális intubáció után az állatokat oxigén ($FiO_2=60\%$) és szobai levegő keverékével 12-15/perc frekvenciával lélegeztettük, 15 ml/ttkg/perc kezdő légzési térfogattal, azután ezt annak függvényében változtattuk, hogy az artériás részleges szén-dioxid nyomást 35-40 Hgmm között maradjon. A jobb és a bal femorális artériát és a jobb vénát kanüláltuk, artériás vérnyomásmérés, vérvétel és folyadékpótlás céljából. Folyamatosan monitoroztuk a K ion, bikarbonát, base excess szinteket és az állapotnak megfelelően pótoltuk kálium klorid oldattal és nátrium bikarbonáttal (8,4 v/v).

A kísérlet alatt egyáltalán nem alkalmaztunk presszorokat, katekolaminokat.

Középvonali laparotomia után áramlásmérőt helyeztünk fel az art. mesenterica superior eredéséhez és a véráramlást monitoroztuk. 2,5 F-es katétert helyeztünk el a vena mesenterica superiorba. A kanülon át heparinizált fiziológiás sóoldatot adtunk és a kanült varrattal rögzítettük. A beleket ezután visszahelyeztük a hasüregbe.

Bal oldali mellkasnyitást végeztünk a negyedik bordaközi behatolásból. A szívburok átvágása után szétválasztottuk a nagyereket, a szív bal kamrájába a szívcsúcson át egy 6 French-es katétert (Millar Instruments, Huston, TX, USA) juttattunk. Az aorta áramlásmérését flow méterrel végeztük.

Cardiopulmonalis bypass (CPB)

Szisztémás antikoagulálást végeztünk nátrium-heparinnal (300 U/ttkg), azután a bal artéria subclaviát kanuláltuk az artériás perfúzió céljából. A jobb pitvarba kanült helyeztünk. Az extrakorporális keringést végző szív-tüdő egység részei: melegítő, vénás rezervoár, gördülőpumpa, membrán oxigenátor, ami 1000 ml Ringer laktát oldattal, nátrium-heparinnal (150 U/kg) és 20 ml nátrium-bikarbonáttal (8,4%) volt feltöltve. A CPB kezdetén az állat testhőmérsékletét 28 °C-ra hűtöttük le. Az aortaleszorítás után a szívet megállítottuk 25 ml/kg kardiopléziás oldattal (NaCl 15 mM, KCl 9 mM, MgCl₂ 4 mM, hisztidin hidroklorid monohidrát 18 mM, hisztidin 180 mM, triptofán 2 mM, mannitol 30 mM, CaCl₂ 0,015 mM, 1 kálium hidrogén 2 oxopentandionát, H₂O).

A szívmegállás ideje alatt a perfúziós áramlást 100 ml/ttkg/percre úgy állítottuk be, hogy a perfúziós nyomást 35-40 Hgmm-en tartsuk. 20 perccel az aorta felengedése előtt elkezdődött a testhőmérséklet visszaállítása. 60 perces szívmegállás után az aortát felengedtük, a szívet normál hőmérsékletű vérrel áramoltattuk át. Ha szükséges volt, a kamrafibrillációt 40 J DC kardioverzióval szüntettük meg. Ahogyan a szív funkciója egyre jobb lett, a szív-tüdő keringést biztosító motort fokozatosan 20 perc alatt állítottuk le az aorta felengedése után. Minden állat 90 perces extrakorporális keringésen esett át, 60 perc szívmegállással. Az aorta felengedése után 60 perces reperfusio következett.

Adatok felvétele és analízise

Az aortanyomást és a bal kamrai nyomást, az artériás áramlásmérőkről a jeleket folyamatosan regisztráltuk egy transzducer egységgel (Schubart, Wiesbaden, Németország) és számítógépen tároltuk további analízis céljából.

3.3.1 Myocardialis károsodás vizsgálata CPB után PARP inhibitor (INO-1001) jelenlétében

Hat állat 1mg/ttkg dózisban PARP inhibitor kapott: INO-1001-t (Inotec Pharmaceuticals, Beverly, MA). Az INO-1001 infundálása az aorta felengedése előtt 5 perccel kezdődött és a reperfusio első 25 percében is tartott. Hat állat kontrollként fiziológiás sóoldat infúzióját kapta.

A szív bal kamrájába juttatott nyomás-térfogat mérő konduktancia elven mérő katéter (6F, Millar Instruments, Houston, TX) és Sigma 5 FD Leycom készülékkel (CDLeycom, Leiden, Netherlands) bal kamrai szisztolés és diasztolés nyomás és térfogat (P-V) jeleket vettünk fel a szív működés során alapállapotban. A verőtérfogatot az aortára helyezett áramlásmérővel mértük, és a konduktancia katéter térfogat jelét ezzel kalibráltuk. Tútelített NaCl oldatot (1ml) juttattunk bolusban a szív jobb pitvarába, mialatt felvettük a bal kamrai P-V görbéket, a parallel konduktancia mérése szempontjából. A v. cava inferior és superior együttes leszorításával egyidejűleg felvett PV görbékből az előző mérések felhasználásával számítottuk a bal kamrai kontraktilitási paramétereket, a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggésből számolt meredekséget (Ees, bal kamrai elaszticitás) és az összefüggést a szív munka és a bal kamrai végdiasztolés térfogat között (preload recruitable stroke work, PRSW). A koszorúér áramlás változását az elülső leszálló coronaria arteriára helyezett mágneses áramlásmérővel mértük a CPB előtt és a reperfusio 60. percében.

3.3.2 Mesenterialis károsodás vizsgálata CPB után PARP inhibitor (PJ-34) jelenlétében

Hat állat 5mg/ttkg dózisban PARP inhibitor kapott: PJ 34-t (Inotec Pharmaceuticals, Beverly, MA). A PJ34 infundálása az aorta felengedése előtt 5 perccel kezdődött és a reperfusio első 25 percében is tartott. Hat állat kontrollként fiziológiás sóoldat infúzióját kapta.

A jobb pitvarba jutott egyszeri acetil-kolin bolus injekció (ACH , 10^{-7} mol) után áramlásméréssel detektáltuk az art. mesenterica superior endothelium függő vazodilatációját, nátrium-nitorprusszid adásával pedig az endothelium független

vazodilatációt (SNP, 10^{-4} mol). Az érválaszt az alap mesenterialis érellenállás százalékában fejeztük ki alapállapotban és a 60 perces reperfusio végén.

Laboratóriumi meghatározásokat végeztünk az artériás és vénás laktát koncentráció és kreatin-kináz aktivitás meghatározására. A szisztémás artériás és a mesenterialis vénás laktát és kreatin-kináz aktivitás különbségéből számoltuk ki a mesenterialis laktát és kreatin-kináz grádiens.

Immunhisztokémiai meghatározás

A PARP enzim szöveti aktiválódását az enzim termékének a poly ADP-ribóznak (PAR) az immunhisztokémiai jelölésével mutattuk ki. Az art. mesenterica sup-hoz tartozó bélterületről biopszia mintákat vettünk alapállapotban és a reperfusio 60. percében. Formalinos fixálás után a mintákat paraffinba ágyasztuk be. A mintákat mikrotómmal metsztük és deparaffinálás után az antigén stabilizálására a metszeteket 0,1 M-os nátrium citrát pufferben inkubáltuk, majd desztillált vízzel mostuk. A mintákat 10%-os (w/v) triklórecetsavval inkubáltuk 10 percig, hogy megelőzzük a PAR lebomlását a PAR glikohidroláz által. Foszfát pufferben mostuk a metszeteket. Az endogén peroxidáz aktivitást gátoltuk 1,5%-os hidrogén-peroxid metanolos oldatával 15 percig. A nem specifikus kötő helyeket 2%-os normál kecske szérummal (PBS-ben oldott) blokkoltuk 1,5 órán át 37 °C-on. A korábbi kísérletekből határoztuk meg az optimális antitest koncentrációt. A PAR ellenes csirke antitestet (Tulip BioLabs, West Points, PA) 1:250, 1:500 hígításban alkalmaztuk, a metszeteket egy éjszakán inkubáltuk 4 °C-on. Azután foszfát pufferrel mostuk, és egy másodlagos antitestet (biotinált kecske anti-csirke immunglobulin G-t, Vector Laboratoires, Burlingame CA) adtunk a mintákhoz, és 30 percig inkubáltuk 30 °C-on. Ezután a metszeteket foszfát pufferrel mostuk, majd Vectastain Elite ABC (peroxidáz) standard kittel és diamino-benzidin szubsztráttal inkubáltuk 30 °C-on 30 percig. A metszeteket nuclear fast red festéssel festettük meg.

3.4 Statisztikai analízis

Minden értéket átlag $\pm$ szórás (standard deviáció SD) adtunk meg. Az adatok normal eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával ellenőriztük. A statisztikai analízist varianciánalízissel (ANOVA) és a Bonferroni post hoc teszttel végeztük. A korreláció meghatározását a Spearman féle rank korrelációs analízissel végeztük.

Minden esetben a $p < 0,05$ fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. Minden vizsgálatot a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Version 10) szoftverrel végeztünk.

4 Eredmények

4.1 Az antioxidáns kapacitás mérése szívműtétre kerülő betegekben

A betegek (n=85) klinikai adatait az 1.A. táblázatban foglaltuk össze. Eredetileg a vizsgálatba 107 beteget vontunk be, de a magas szérum CRP érték (> 10 mg/L) miatt a VHD csoportból 8 beteget (5 ffi/3 nő), a CAD csoportból 14 beteget (4 ffi/10 nő) kizártunk. Nem volt szignifikáns különbség a két csoport között (VHD vs. CAD) az átlagéletkorban (56,8 vs. 59,4 év) vagy a bal kamrai ejekciós frakciót tekintve (56,8 vs. 57,0 %). A New York Heart Association (NYHA) beosztása alapján a betegek nagyobb hányada volt rosszabb klinikai állapotban a VHD csoportban, mint a CAD csoportban NYHA III-IV és IV.: 22,9% vs. 8%). A koszorúérbetegek között nagyobb volt az aránya a több rizikótényező előfordulásának összehasonlítva a billentyűbetegekkel (magasvérnyomás betegség 82% vs 42,8%, II. típusú cukorbetegség 42% vs. 17%, lipid anyagcserezavar 68% vs. 34,3%, dohányzás 28% vs. 6,7%).

1. A. táblázat: A vizsgált betegek klinikai adatai

	Koszorúérbeteg (CAD)			Billentyűbeteg (VHD)		
	Férfi N=28	Nő N=22	Összes N=50	Férfi N=15	Nő N=20	Összes N=35
Kor (év)	61,9 (43-73)	56,9 (41-72)	59,4	56,6 (36-75)	57 (22-78)	56,8
Instabil angina	7	7	14 (28%)	0	0	0
Effort angina	17	13	30 (60%)	0	0	0
Silent ischaemia	3	2	5 (10%)	0	0	0
AMI	11	9	20 (40%)	0	0	0
NYHA II.	6	1	7 (14%)	3	1	4 (11%)
NYHA II-III.	10	8	18 (36%)	2	6	8 (23%)
NYHA III.	10	11	21 (42%)	6	9	15 (42,8%)
NYHA III-IV.	2	2	4 (8%)	3	2	5 (14,3%)
NYHA IV:	0	0	0	1	2	3 (8,6%)
EF%	58,0% (30-77)	56,1% (38-70)	57,0%	53% (20-78)	60,4% (34-77)	56,8%
Érintett koszorú- erek száma N=1	0	3	3 (6%)	0	0	0
N=2	5	10	15 (30%)	0	0	0
N=3	23	9	32 (64%)	0	0	0

A koszorúérbetegek nagyobb arányban kaptak trombocita aggregációt gátló, β blokkoló, és ACE gátló gyógyszereket. A billentyűbetegek közül háromszor többen részesültek diuretikus kezelésben, mint az ischaemiás szívbetegek (1. B. táblázat).

1. B. táblázat: Gyógyszerszedés a vizsgált betegek anamnézisében

	Koszorúérbeteg (CAD)			Billentyűbeteg (VHD)		
	Ffi N=28	Nő N=22	Összes N=50	Férfi N=15	Nő N=20	Összes N=35
Trombocita aggr. gátló	79%	90%	84%	33%	30%	31,4%
β blokkoló	71	90%	80%	60%	60%	60%
ACE gátló	68%	68%	68%	53%	45%	48%
Diuretikum	14%	22%	18%	46%	45%	45%
Statin	50%	59%	54%	33%	20%	25%

A billentyűbetegekben szignifikánsan magasabb ($p<0,05$) TAS értékeket mértünk a szérumban, mint koszorúérbetegekben. A szérum albumin és az összfehérje szintek nem különböztek szignifikánsan a két betegcsoport között. A szérum húgysav értéke szignifikánsan ($p<0,01$) magasabb volt billentyűbetegekben (VHD), mint a koszorúérbetegség miatt bypass műtött betegekben (CAD). (2. táblázat).

2. táblázat A szérum és a pericardialis folyadék antioxidáns profilja betegcsoportok (koszorúérbeteg CAD, billentyűbeteg VHD) szerinti bontásban

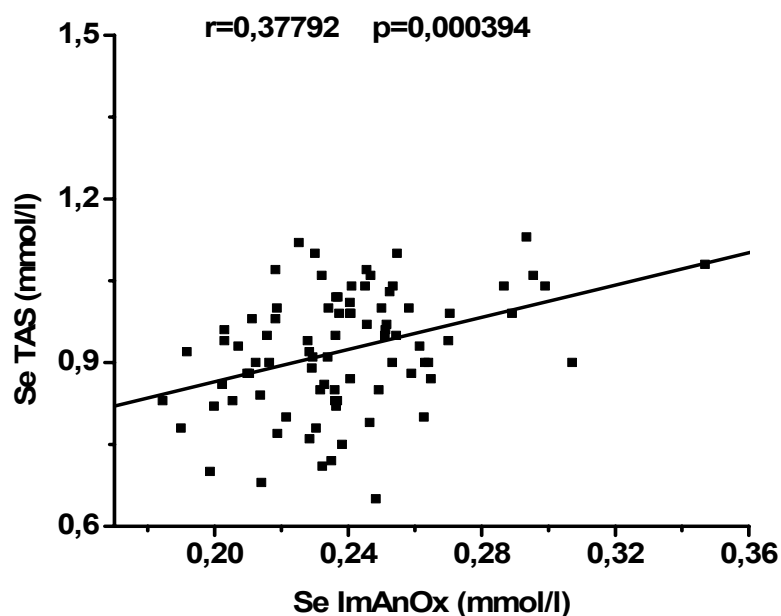
	Szérum		Pericardialis folyadék	
	VHD (n=35)	CAD (n=50)	VHD (n=35)	CAD (n=50)
TAS (mmol/l)	0,97 $\pm$ 0,15*	0,90 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,19	0,63 $\pm$ 0,13
ImAnOx (mmol/l)	0,24 $\pm$ 0,034	0,24 $\pm$ 0,022	0,21 $\pm$ 0,031	0,23 $\pm$ 0,023
Húgysav (μ mol/l)	313,7 $\pm$ 130,5*	243,4 $\pm$ 99,6	335,97 $\pm$ 143,4*	245,4 $\pm$ 100,3
Albumin (mmol/l)	0,59 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,09
Összfehérje (g/l)	58,9 $\pm$ 5,4	59,36 $\pm$ 7,3	28,9 $\pm$ 9,2	28,5 $\pm$ 9,5

TAS, teljes antioxidáns státusz, ImAnOx, antioxidáns kapacitás márkánév

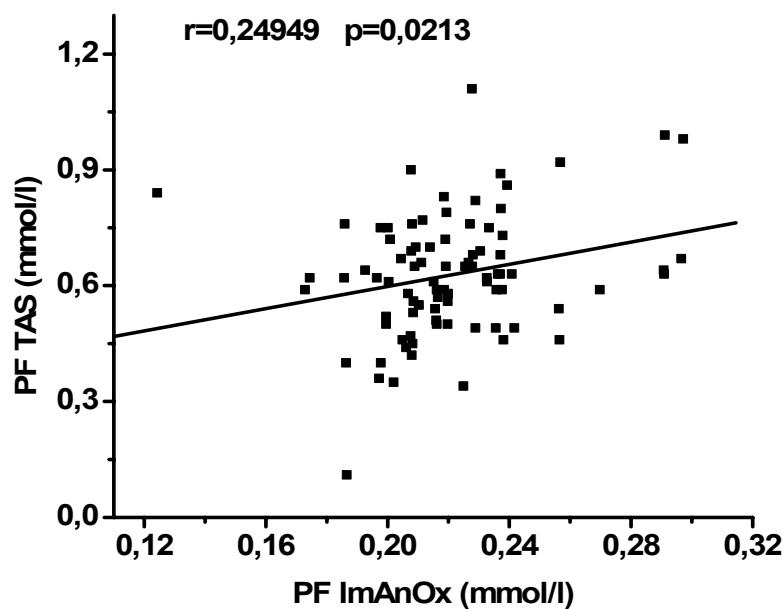
Az értékeket átlag $\pm$ SD adtuk meg, * $p < 0,01$ VHD vs CAD

Összehasonlítottuk a két egymástól független antioxidáns kapacitást mérő módszert (TAS és ImAnOx). Szignifikáns összefüggés van a két módszerrel mért adatok között a szérumban és a PF-ben is (3 A,B ábra).

A



B



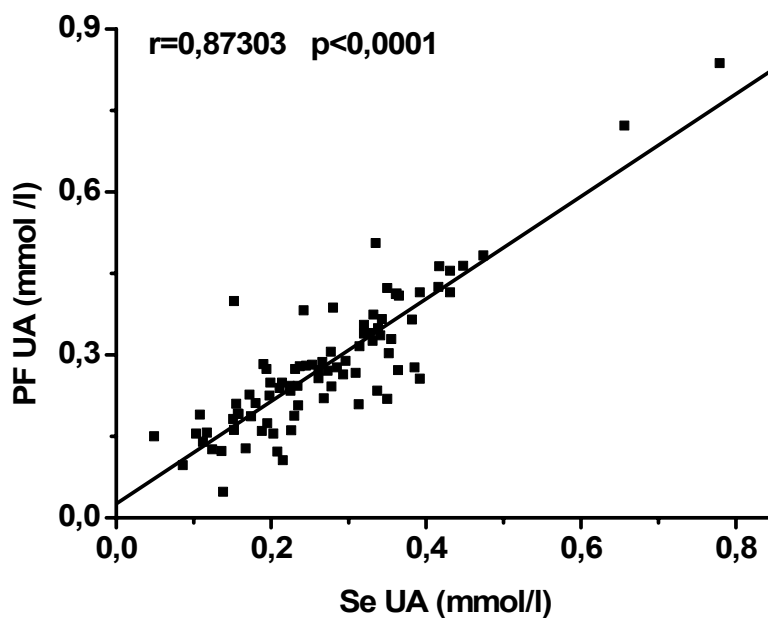
3. ábra A. Korreláció a két antioxidáns kapacitást mérő módszer között a szérumban és B: a pericardialis folyadékban (PF) (összes adat n=85)

Az összes beteg adatait vizsgálva a szérumban magasabb TAS, albumin és összfehérje szinteket mértünk összehasonlítva a pericardialis folyadékban mért paraméterekkel (3. táblázat).

3. táblázat Antioxidáns profil a szérumban és a pericardialis folyadékban az összes mintában * $p < 0,001$ Se vs Pf

	Szérum (n=85)	Pericardialis folyadék (n=85)
TAS (mmol/l)	$0,93 \pm 0,13^*$	$0,63 \pm 0,16$
ImAnOx (mmol/l)	$0,24 \pm 0,028^*$	$0,22 \pm 0,028$
Húgysav ($\mu\text{mol/l}$)	$272,3 \pm 117,8$	$282,7 \pm 127,2$
Albumin (mmol/l)	$0,57 \pm 0,06^*$	$0,34 \pm 0,09$
Összfehérje (g/l)	$59,17 \pm 6,6^*$	$28,7 \pm 9,3$

A szérumban és a pericardialis folyadékban mért húgysav koncentrációk szignifikánsan korreláltak az összes beteg adatait összevetve (4. ábra).



4. ábra: Korreláció a szérumban (Se) és pericardialis folyadékban (PF) húgysav (UA) koncentrációja között

A kapott eredmények birtokában az antioxidáns kapacitást betegcsoportoktól függetlenül az összes vizsgált betegben nemek szerinti bontásban is megnéztük. Az összes vizsgált betegben mért húgysavkoncentrációk mind a szérumban, mind a pericardialis folyadékban magasabbak voltak férfiak esetében. A PF albumin és összfehérje koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak voltak a nőbetegektől származó mintákban, mint férfiakban (4. táblázat).

4. táblázat Nemi különbségek a pericardialis folyadék antioxidáns értékeiben az összes mintában

	Szérum		Pericardialis folyadék	
	Férfi (n=43)	Nő (n=42)	Férfi (n=43)	Nő (n=42)
TAS (mmol/l)	0,93±0,14	0,93±0,1	0,62±0,17	0,64±0,15
ImAnOx (mmol/l)	0,241±0,028	0,237±0,027	0,219±0,015	0,223±0,036
Húgysav (μmol/l)	294,8±125,5	249,3±106,03	312,4±132,7*	252,3±115,15
Albumin (mmol/l)	0,57±0,07	0,57±0,06	0,38±0,09**	0,3±0,08
Összfehérje (g/l)	58,96±7,2	59,4±5,9	32,4±9,6**	24,9±7,5

*p <0,05 Se vs PF, ** p<0,001 férfi vs. nő

4.2 Oxidatív stressz mérése-AOPP meghatározás

4.2.1 Az AOPP referencia tartomány meghatározása

A plazmamintákból a fenti automatizált módszerrel mért AOPP eredmények a Kolmogorov-Smirnov test alapján normál eloszlást mutattak. A nő hallgatók plazmájában szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) AOPP koncentrációt mértünk, mint a férfi hallgatók plazmájában (5. táblázat).

A kontroll egyénektől származó AOPP referenciaértékek az irodalmi adatok szerint:

$29,4 \pm 4,9 \mu\text{mol/l}$ ($n=10$) (Witko-Sarsat V és mtsai 1996) és $32,0 \pm 1,4 \mu\text{mol/l}$ ($n=140$) (Kaneda H és mtsai 2002). Ezekben a vizsgálatokban a szerzők nem tértek ki az esetleges nemi különbségekre.

5. táblázat Az AOPP referencia értékei kontroll csoportban (egyetemi hallgatók) átlagéletkor 21,3 év (18-33 év)

Plazma	Kontroll csoport		
	Összes ($n=266$)	Férfi ($n=81$)	Nő ($n=185$)
AOPP $\mu\text{mol/L}$	$22,3 \pm 6,3$	$19,1 \pm 5,5$	$23,7 \pm 6,1$ *
Kvartilisek			
25%	17,4	15,2	19,2
50% (medián)	21,9	17,7	23,7
75%	26,8	22,0	27,6
Konfidencia intervallum	12,8-33,7	12,5-28,4	13,5-34,9

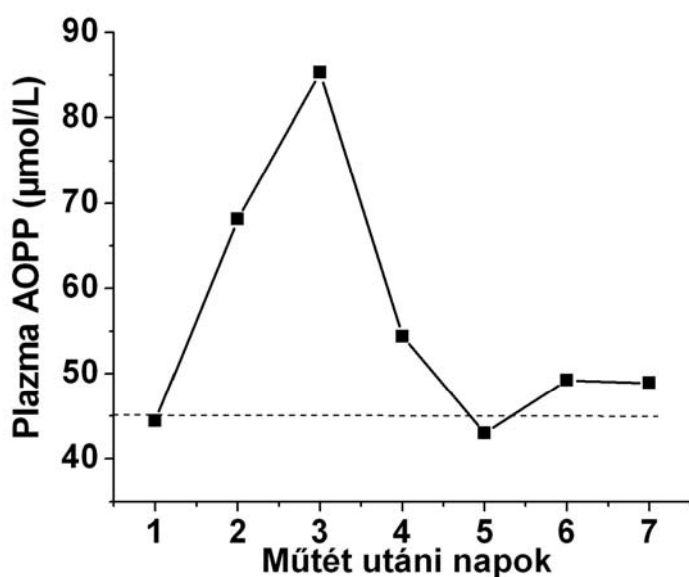
Az AOPP koncentrációkat kloramin-T ekvivalensekben adtuk meg..

Az adatokat átlag $\pm$ SD adtuk meg. * $p < 0,001$ férfiak vs. nők

4.2.2 Oxidatív stressz vizsgálata kritikus állapotú betegekben

Kritikus állapotban lévő, intenzív osztályos kezelést igénylő betegeket (szívtranszplantáció, elektív aorta aneurizma műtét vagy akut aneurizma ruptura eseteit, alsó végtagi elzáródás műtete utáni ischaemia-reperfusio, sepsis, stroke) vizsgáltunk. Ezek a stressz állapotok megnövekedett szabadgyök képződéssel járnak. Célunk volt megvizsgálni az AOPP-nek, mint oxidatív stressz markernek a kritikus állapot monitorozásra való alkalmasságát és az összefüggést a szövődmények kialakulása, a feltételezett oxidatív stressz és az AOPP értékek változása között. Az alábbiakban a felsorolt betegségcsoportokból egy-egy reprezentatív eset kerül bemutatásra.

Ischaemia-reperfusio:

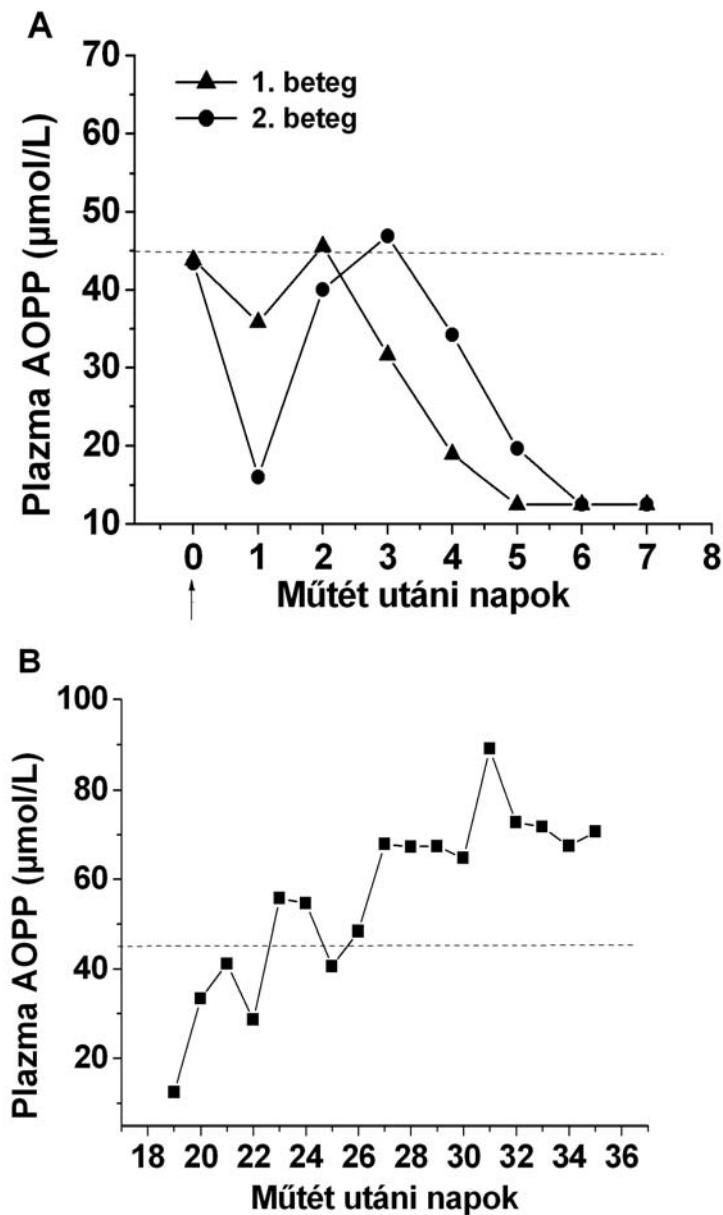


5. ábra: Érelzáródás miatt iliofemorális desobliteráción átesett beteg (férfi, 54 év) műtét utáni plazma AOPP értékeinek változása

A kiindulási érték is magasabb az alsó végtagi érelzáródás miatt. Az akut thrombectomy után az AOPP jelentős emelkedést mutatott, ami az addig ischaemiás területen a véráramlás újraindulása után a megnövekedett szabadgyök képződést, a reperfusios károsodást jelzi. A műtét utáni 5-6. napon az AOPP közelített a referencia értékekhez (5. ábra).

Szívtranszplantáció:

Szívtranszplantáción átesett betegekben a műtét előtt és a műtét után vettünk vért. A szövődmenymentes esetekben a műtét utáni 4-5 napon az AOPP a referencia értékek szintjére csökkent a komplikációktól mentesen gyógyuló betegekben (6. A ábra).

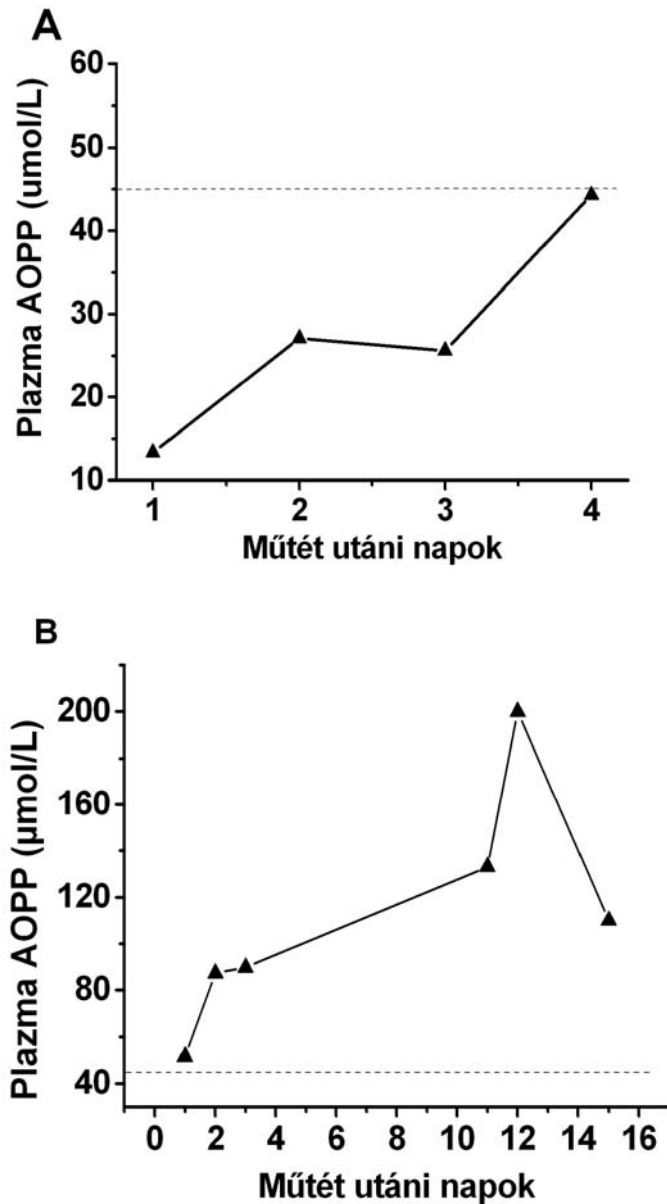


6. ábra: Az AOPP értékek változása a műtét utáni időszakban szívtranszplantáció komplikációtól mentes (A) és szövődmenyes esetében (B).

A szívátültetés utáni szövődmenyesben (sokszervi elégtelenség) szenvedő férfibeteg esetében az AOPP értéke fokozatosan emelkedett 70-90 $\mu\text{mol/L}$ (7.B ábra).

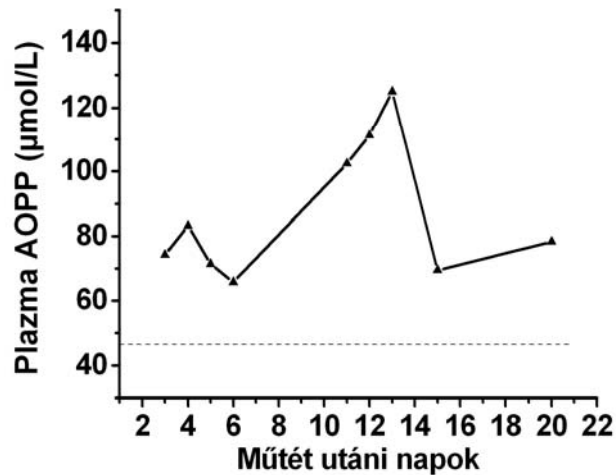
Aorta aneurizma ruptura: Az acut aneurizma ruptura súlyos vérvesztéses állapot, keringési shock kíséri. Az acut műtét utáni napokban alacsony AOPP szinteket mérünk, ami a 3-4. nap körül kezd el emelkedni.

Az elektív aneurizma ruptura eseteiben a kiindulási érték is magas, a műtét után az ischaemia-reperfusio miatt tovább emelkedik (7. A, B ábra).



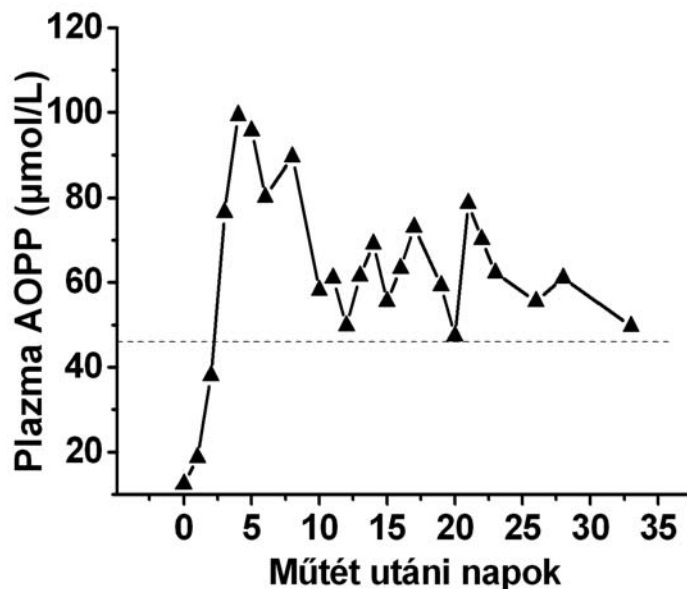
7. ábra: Acut aneurizma ruptura (A) és elektív aneurizma ruptura (B) miatt végzett műtét után az AOPP szintek változása

Stroke: CABG műtét után ischaemiás stroke-t elszenvedett betegben az AOPP koncentráció emelkedés a betegség kialakulását gyorsan követte (8. ábra).



8. ábra: CABG műtét után 2 nappal ischaemiás stroke-t elszenvedett beteg (77 éves férfi) AOPP értékei

Sepsis: Alsó végtagi érelzáródás miatti thrombectomiát követően, a műtét után kialakult ischaemia-reperfusio állapotában az AOPP kiugróan emelkedett, de a fellépő septicus tünetek miatt mintegy három hétig magas értékeket mértünk (9. ábra).



9. ábra: Plazma AOPP szintek változása perifériás érbetegben, infrapopliteális trombus műtéti eltávolítását követően kialakult sepsisben (44 éves férfi)

4.2.3 Oxidatív stressz vizsgálata akut coronaria szindrómában (ACS)

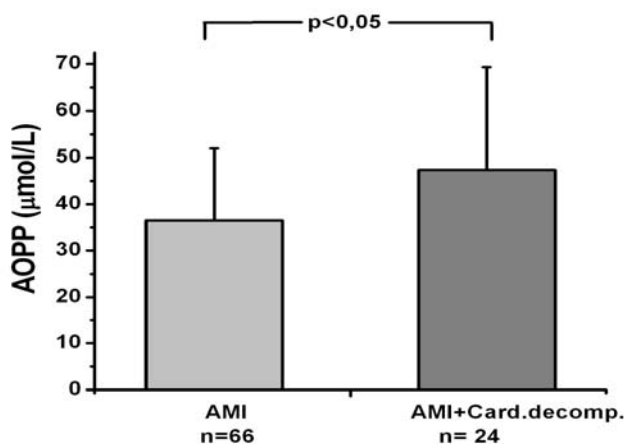
Az akut vagy effort angina tüneteivel szívkatéterezésre kerülő betegekben az invazív beavatkozás előtt AOPP meghatározásokat végeztünk az oxidatív stressz állapot megítélésére. Próbáltunk összefüggést keresni a társbetegségek, a szövődményes esetek és az oxidatív stressz súlyossága között. Az akut anginás tünetekkel érkező betegeknél a tünetek jelentkezése és a kórházba kerülés között eltelt idő igen változó volt, fél órától 12 óráig terjedt.

Az összes beteg ($n=156$) AOPP értéke $38,5 \pm 17,1 \mu\text{mol/L}$ nem haladta meg az általunk meghatározott AOPP referenciatartomány felső határát.

Az akut myocardiális infarktust elszenvedő betegek az instabil anginás betegekkel együtt alkották az akut coronaria szindrómás ($n=113$, ACS) csoportot.

Az effort anginás betegek és az akut coronaria szindrómás betegek AOPP értéke között szignifikáns különbséget nem találtunk ($35,6 \pm 10,1$ vs. $39,7 \pm 17,5 \mu\text{mol/L}$). Az instabil anginás betegek között nem fordult elő cardialis decompensáció szövődmény.

Az akut myocardiális infarktust elszenvedő betegek között a cardialis decompensáció szövődménye a kórházba való felvételkor 24 betegnél állt fent. Az AOPP értéke szignifikánsan magasabb volt a cardialis decompensáció megléte esetén összehasonlítva a szövődménymentes AMI esetekkel (10. ábra).



10. ábra: Plazma AOPP értékek szövődmény nélküli akut myocardiális infarktusból (AMI) és cardialis decompensációval szövődött eseteivel (AMI+ Card. decomp.).

Az adatokat átlag $\pm$ SD adtuk meg.)

Vizsgáltuk a társbetegségek előfordulását. A hypertensio, a társuló hiperlipidémia nem befolyásolta az AOPP értékeket. Azokban az ACS betegekben, akik diabéteszesek voltak, szignifikánsan magasabb AOPP értékeket mértünk, mint a nem diabéteszes betegekben (6. táblázat).

6. táblázat AOPP koncentrációk acut coronaria szindrómás betegekben társbetegségek előfordulása esetén

ACS csoport (n=113)	AOPP (μmol/L)		
Társbetegség	Igen	Nem	p
Hypertonia (n=82)	40,0 ± 2,0	38,0 ± 3,4	ns.
Diabetes (n=33)	47,8 ± 2,2	36,1 ± 1,4	<0,01

Az adatokat átlag ± SEM adtuk meg

Az összes beteg adatait vizsgálva a veseelégtelenség az AOPP szint jelentős növekedését okozta összehasonlítva a jó vesefunkciójú betegekkel. A gyulladás (pneumonia, sepsis) igen jelentős AOPP emelkedést okozott, összehasonlítva a többi beteggel (7. táblázat).

7. táblázat: AOPP koncentrációk az összes betegben szövődmények előfordulása esetén

Összes beteg (n=156)	AOPP (μmol/L)		p
Előfordulás	Igen	Nem	
Gyulladás (pneumonia, sepsis) (n=7)	57,0 ± 10,0	36,9 ± 1,2	<0,01
Veseelégtelenség (n=7)	51,2 ± 6,3	35,9 ± 1,2	<0,01

Az adatokat átlag ± SEM adtuk meg

4.2.4 Oxidatív stressz vizsgálata perifériás érbetegekben

Perifériás érbetegségben szenvedő betegekben az invazív beavatkozások előtt az AOPP meghatározásokat azzal a céllal végeztünk, hogy az oxidatív stressz állapotot felmérjük és megvizsgáljuk a társbetegségek, a szövődményes esetek és az oxidatív stressz súlyossága közötti összefüggéseket.

Az alsó végtagi érszűkület/elzáródás és carotis szűkület miatt operált betegek műtét előtti AOPP értékei magasabbak voltak a referenciaértékeknél.

A carotis szűkület miatt operált betegekben nőkben magasabb AOPP szintet mértünk, a különbség nem volt szignifikáns.

A carotis szűkületben szenvedő betegekben a társbetegségeket vizsgálva a kombináltan hipertonia és diabetes rizikófaktorok megléte esetén nem emelkedett szignifikánsan az AOPP érték összehasonlítva a csak hipertóniás vagy csak diabeteses betegek AOPP értékeit. (8. táblázat).

8. táblázat: Plazma AOPP értékek alsó végtagi érelzáródás és carotis stenosisban szenvedő betegekben. Az adatokat átlag $\pm$ SD adtuk meg.

Diagnózis	N	AOPP ($\mu\text{mol/L}$) Átlag $\pm$ SD
Összes beteg	179	57,9 $\pm$ 27,2
Carotis stenosis	66	56,1 $\pm$ 24,1
Carotis stenosis, férfi	42	54,1 $\pm$ 25,6
Carotis stenosis, nő	24	59,6 $\pm$ 21,3
Carotis stenosis, hipertonia	14	55,7 $\pm$ 25,2
Carotis stenosis, diabetes	15	56,8 $\pm$ 36,3
Carotis stenosis, hipertonia és diabetes együtt	14	59,0 $\pm$ 36,5

Az alsó végtagi elzáródásban szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb AOPP értéket mértünk azokban a betegekben, akiknél alsó végtagi gangréna alakult ki, összehasonlítva a nem gangrénás betegekkel (9. táblázat).

9. táblázat: Plazma AOPP értékek alsó végtagi érelzáródás esetén gangréna szövődémmel. Az adatokat átlag $\pm$ SD adjuk meg.

Diagnózis	N (Ffi/Nő)	AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	
Alsó végtagi elzáródás, gangréna nincs	113 (79/34)	$55,2 \pm 23,6$	P<0,01
Alsó végtagi elzáródás, gangréna van	16	$76,4 \pm 41,8$	

4.3 Oxidatív stressz vizsgálata állatkísérletes modellben

4.3.1 Myocardiális károsodás vizsgálata CPB után PARP inhibitor (INO-1001) jelenlétében

Az INO-1001 és a kontroll csoportban a hemodinamikai paraméterek a cardiopulmonaris bypass megkezdése előtt a normál tartományban voltak. 60 perces szívmegállás után a 60 perces reperfuziot követően a kontroll csoportban az artériás középnyomás szignifikánsan csökkent, míg a PARP gátló alkalmazása mellett nem változott jelentősen. A perctérfogatban nem találtunk különbséget a két csoport között. A koszorúér áramlás a 60 perces reperfusio végére szignifikánsan csökkent a kontroll csoportban, az INO-1001 alkalmazása mellett változatlan maradt.

A szív kontraktilitásának terhelés független paraméterei: a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggésből számolt meredekség (Ees), a bal kamrai elaszticitás és a pressure recruitable stroke work (PRSW) a reperfusio 60 percére szignifikánsan csökkent a kontroll csoportban, az INO-1001 csoportban nem változott (10. táblázat).

10. táblázat: Hemodinamikai paraméterek a cardiopulmonaris bypass megkezdése előtt (alapállapot) és a 60 perces reperfusio után az INO-1001 csoportban

	Alapállapot		60 perces reperfusio	
	Kontroll	INO-1001	Kontroll	INO-1001
HR (ütés/min)	110 ± 6	112 ± 7	126 ± 9	112 ± 8
MAP (Hgmm)	98 ± 7	93 ± 5	73 ± 5*	89 ± 6**
CO (L/min)	2,52 ± 0,51	2,97 ± 0,79	2,03 ± 0,37	3,67 ± 0,88
Ees (Hgmm/ml)	5,5 ± 1,1	4,8 ± 0,4	2,6 ± 0,3*	4,2 ± 0,4**
PRSW (Kerg)	75 ± 4	76 ± 8	56 ± 6*	70 ± 7**
CBF (mL/min)	42 ± 6	48 ± 5	21 ± 3*	52 ± 4**

*p<0.05 vs. alapállapot, **p<0.05 INO-1001 vs. kontroll. Szívfrekvencia (HR), artériás középnyomás (MAP), perctérfogat (CO), A végszisztolés nyomás-térfogat összefüggésből számolt meredekség (Ees), pressure recruitable stroke work (PRSW).

4.3.2 Mesenterialis károsodás vizsgálata CPB után PARP inhibitor (PJ34) jelenlétében

A kiindulási hemodinamikai paraméterek nem különböztek lényegesen a két csoport között és a normál tartományban voltak.

A 60 perces szívmegállás és a 60 perces reperfusio után a kontroll csoportban az artériás középnyomás szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) összehasonlítva a PJ34 csoporttal, ahol változatlan maradt. A szív által kilökött vér mennyisége nem különbözött szignifikánsan a két csoport között. A szív bal kamrájában mért időegység alatti nyomásváltozás maximuma, dP/dt_{max} , ami a kontraktilitásra utal, a cardiopulmonaris bypass után szignifikánsan magasabb volt a PARP inhibitorral kezelt csoportban (11. táblázat).

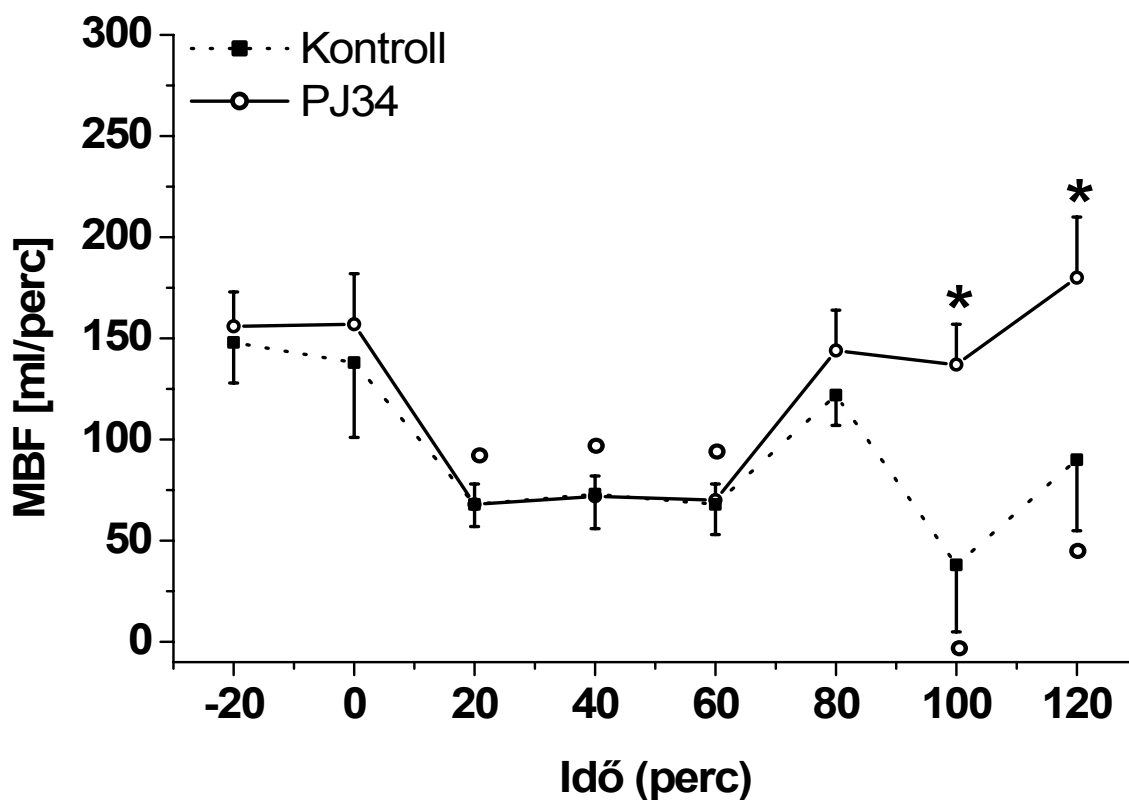
11. táblázat: Hemodinamikai paraméterek a cardiopulmonaris bypass megkezdése előtt (alapállapot) és a 60 perces reperfusio után a PJ34 csoportban

	Alapállapot		60 perces reperfusio	
	Kontroll	PJ34	Kontroll	PJ34
HR (ütés/min)	110 ± 6	112 ± 7	127 ± 9	113 ± 8
MAP (Hgmm)	96 ± 9	92 ± 9	70 ± 6*	86 ± 6**
CO (l/perc/kg)	96 ± 9	105 ± 8	85 ± 9	93 ± 10
SV (ml)	24 ± 2	22 ± 5	16 ± 2*	20 ± 4
LVE SP (Hgmm)	119 ± 8	114 ± 11	92 ± 7*	105 ± 7
LVEDP (Hgmm)	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 3	9 ± 2
dP/dt_{max} (Hgmm/s)	1514 ± 521	1479 ± 314	1066 ± 204*	1392 ± 276**

* $p < 0.05$ vs. alapállapot, ** $p < 0.05$ PJ34 vs. kontroll. Az értékeket átlag ± SEM adtuk meg. Perc térfogat (CO), maximum pressure development (dP/dt_{max}), szívfrekvencia (HR), bal kamrai végdisztolés nyomás (LVEDP), bal kamrai végdisztolés nyomás (LVE SP), artériás középnyomás (MAP).

A mesenterialis véráramlás kezdetben a PJ34 és a kontroll csoportban hasonló értéket mutatott és a szív-tüdő keringés ideje alatt szignifikáns csökkenést mutatott a kiindulási értékhez képest.

A reperfusio ideje alatt a PJ34 csoportban a mesenterialis áramlás kezdett a kiindulási értékhez közelíteni, míg a kontroll csoportban továbbra is alacsony maradt (11. ábra).

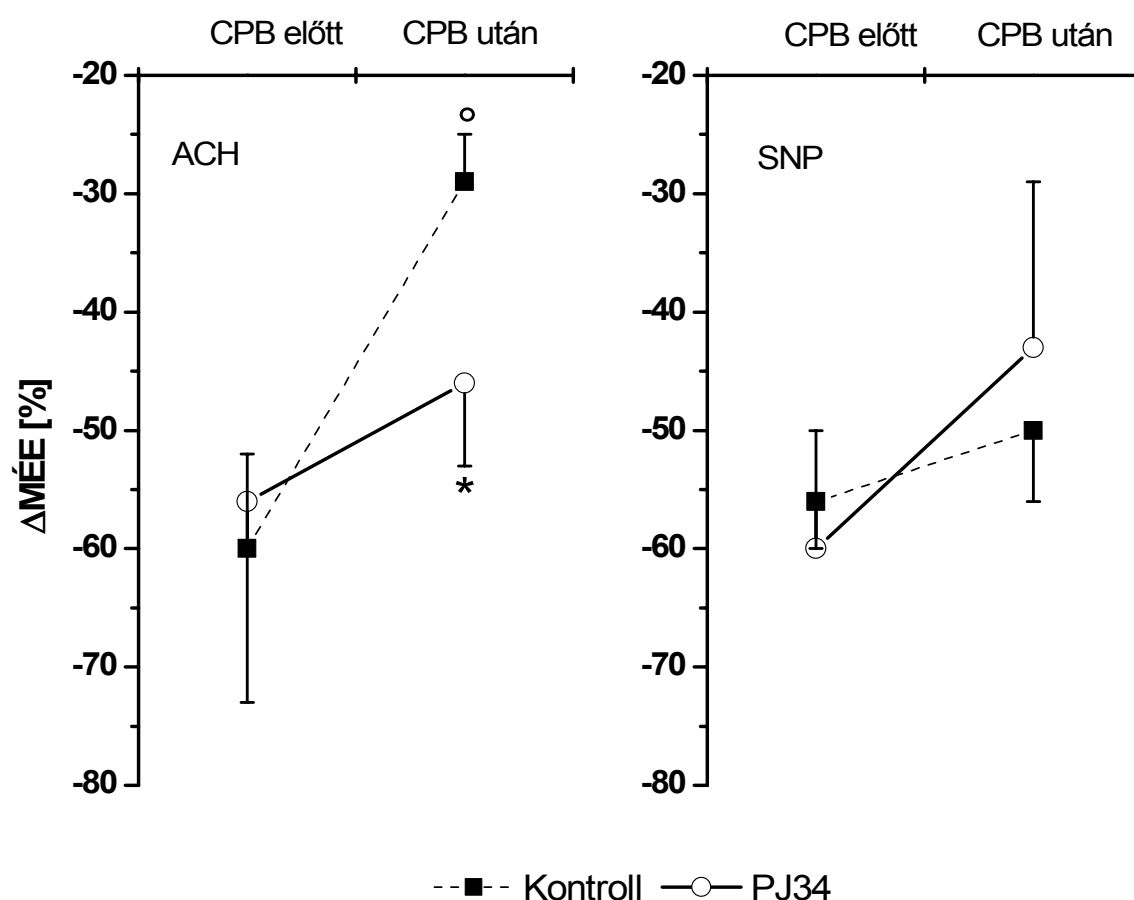


11. ábra: Az arteria mesenterica superioron mért áramlás (MBF: mesenteric blood flow)

A „0” pont jelzi az idő skálán a cardiopulmonaris bypass kezdetét

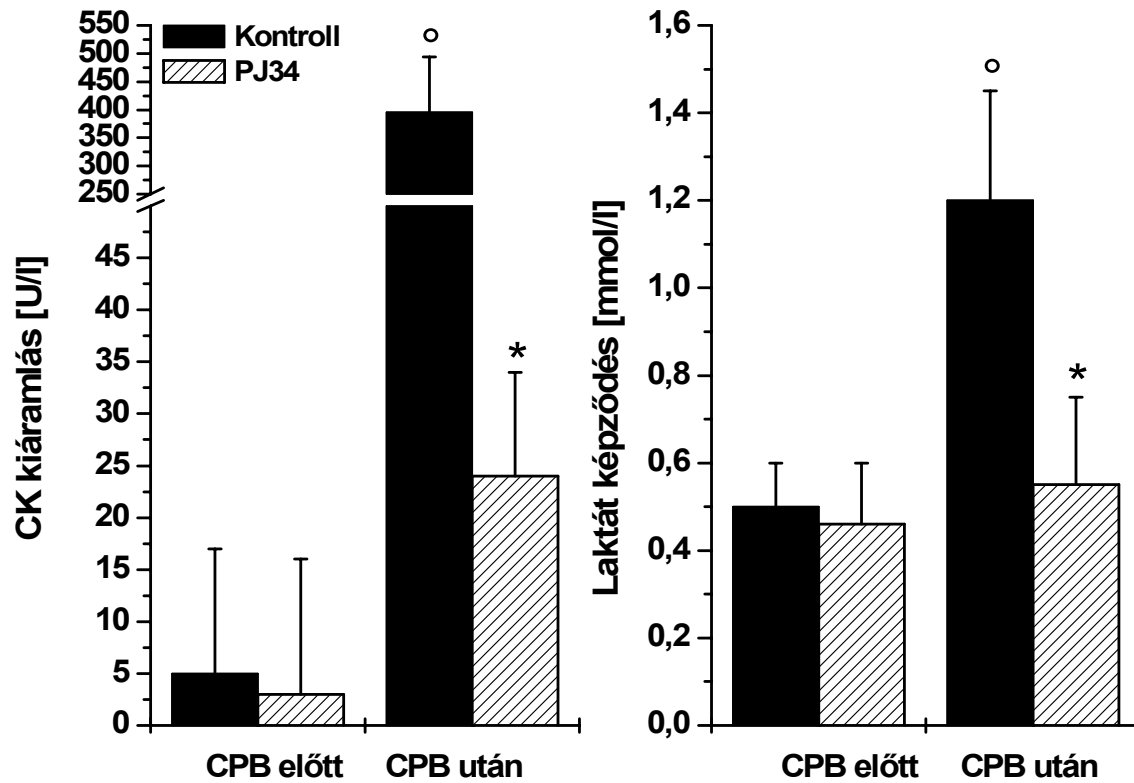
Minden adatot átlag $\pm$ SEM adtunk meg, $^{\circ}p < 0.05$ vs. alapállapot, $*p < 0.05$ PJ34 vs. kontroll

Az érműködést az acetil-kolinra adott endothelium függő vazorelaxáció kiváltásával vizsgáltuk. Az érválasz ACH-ra a kezdeti állapotban nem különbözött jelentősen a két csoport között. A perfusio 60 percében vizsgált ACH-ra adott vazodilatációs válasz szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoportban, mint a PJ34 csoportban. Az endotheliumtól független relaxációt SNP adásával vizsgáltuk, ami sem a kezdeti, sem a 60 perces perfusio után nem mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között (12. ábra).



12. ábra: Mesenterialis érműködés. Az endothelium függő vazodilatáció acetil-kolin (ACH 10^{-7} mol) és az endotheliumtól független vazodilatáció nátrium nitroprusszid (SNP 10^{-4} mol) adása után a mesenterialis érellenállás százalékában ($\Delta M\acute{E}E$) a cardiopulmonaris bypass (CPB) előtt és után a perfusio 60 percében. Minden adatot átlag $\pm$ SEM adtunk meg, °p<0.05 vs. alapállapot, *p<0.05 PJ34 vs. kontroll

A 60 perces reperfusionnál mért mesenterialis laktát termelés és kreatin-kináz kiáramlás szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportban a kiindulási értékhez képest és a PJ34 csoportban mért 60 perces értékhez képest (13. ábra).



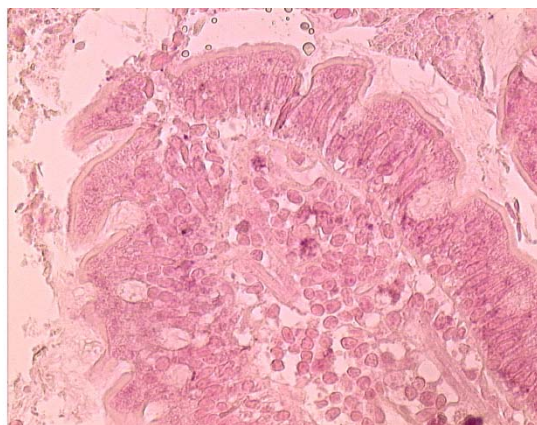
13. ábra: Mesenterialis kreatin kináz (CK) kiáramlás és laktát képződés a cardiopulmonaris bypass (CPB) előtt és után a reperfusio 60. percében.

Minden adatot átlag $\pm$ SEM adtunk meg, $^{\circ}p < 0.05$ vs. alapállapot, $*p < 0.05$ PJ34 vs. kontroll

A poli (ADP) ribózt a vékonybél biopsziás mintákból immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki. A cardiopulmonaris bypass kezdetén vett biopsziákban nem volt kimutatható a PAR. A szívmegállás és a 60 perces reperfusio után a kontroll csoportból nyert mintákban kifejezett PAR aktiváció volt, ami a PJ34 kezelt csoportban nem volt (14. ábra).



A



B

14. ábra: A: kontroll B, PJ34 előkezelés. Immunhisztokémiai festés a poly (ADP) ribózra (PAR) (400x nagyítás). A festés a poly (ADP) ribóz polimeráz aktivációt jelzi a vékonybél biopsziából készült metszetekben. Az A képen a cardiopulmonalis bypass utáni metszetben kontroll csoportban PAR pozitív a festés. A bél mucosa sejteinek magja erős sötét festést mutat, majdnem minden sejtmagban (nyíl). A PJ34 csoportban negatív a PAR festődés. A sejtmagok nem festődtek, a PJ34 gátolta a PARP aktivációt a bél mucosában.

5 Megbeszélés

5.1 *Az antioxidáns kapacitás mérése szívműtétre kerülő betegekben*

A pericardialis folyadék szoros összeköttetése a myocardialis sejtek közötti térrel adja meg a lehetőséget arra, hogy vizsgálatából következtessünk a myocardium helyi viszonyaira, közvetlenebb információkhoz jutva, mintha kizárólag a szérumot vizsgálnánk. Az extracelluláris folyadéktér aktívan részt vesz a szabadgyökök eliminálásában. Mivel irodalmi adat nem állt rendelkezésre a pericardialis folyadék antioxidáns aktivitása tekintetében, ezért szerepelt célkitűzésünkben vizsgálta. A mért paramétereket párhuzamosan határoztuk meg a szérumban és a pericardialis folyadékban, a folyadékok egymáshoz való viszonyainak jobb megértése céljából. Két független mérőmódszert alkalmaztunk az antioxidáns kapacitás mérésére: a TAS és az ImAnOx módszert. A két módszerrel mért paraméterek mind a szérumban, mind a pericardialis folyadékban egymással szoros összefüggést mutattak. Mindamellett a pericardialis folyadékban a korreláció kisebb, de statisztikailag így is szignifikáns volt. Koracevic D. és mtsai (2001) a különböző testfolyadékok antioxidáns aktivitását határozták meg: a nyálban 41%, a veseciszta folyadékban 19%, az ascites folyadékban 13%, a könnyben 12%, a vizeletben 9%, a liquorban 5%, a szem csarnokvízben 3% volt az antioxidáns aktivitás a szérumban mérték érték százalékában. Méréseink alapján a pericardialis folyadék antioxidáns kapacitása a szérumszintek közel 68%-a, ami viszonylag magas értéknek számít, sorrendben a testfolyadékok között a szérum/plazma után következik.

A szérum antioxidáns kapacitása alacsonyabb volt, mind a két betegcsoportban, az egészséges népességben mért referencia értékekkel összehasonlítva (TAS: 1-1,2 mmol/L, ImAnOx: 0,28-0,32 mmol/L, a gyártók ajánlásai alapján).

Ennek magyarázata lehet a krónikusan fennálló betegség állapot, ennek következtében fokozott antioxidáns felhasználás. Ischaemiás szívbetegekben és magasvérnyomás betegségben szenvedő betegekben alacsonyabb TAS szinteket mértek a referenciaértékeknél és a vérnyomáscsökkentő kezelés hatásosságát már két hét után jelezte a TAS szint növekedése (Lantos J és mtsai 1997).

A szérumban szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) TAS értékeket mértünk billentyűbetegekben, mint koszorúérbetegekben. Ennek oka lehet a VHD betegeknél nagyobb arányban alkalmazott diuretikus kezelés, ami a szérumban a húgysav szintek megemelkedéséhez vezetett. A TAS jelentős részét a húgysav és az albumin adja (Miller NJ. és mtsai 1993). A CAD betegekben mért alacsonyabb TAS szint oka lehet a krónikusan fennálló ischaemiás állapot és az ezzel együtt járó oxidatív stressz. Mások szoros összefüggést mutattak ki a TAS szintek és a megbetegedett koszorúerek száma között (Nojiri S és mtsai 2001).

Szívelégtelenségben a NYHA stádiumok növekedésével csökkent A, E vitamin és lutein szinteket, valamint emelkedett malondialdehid koncentrációt mutattak ki (Polidori MC és mtsai 2002). Vizsgálatainkban nem találtunk összefüggést a betegek klinikai stádiuma (NYHA) és a mért AOC értékek között, lehetséges, hogy azért, mert az AOC nem közvetlen markere az oxidatív stressznek, csupán általánosságban utal a szervezet antioxidáns státuszára.

Vizsgálatunkban a szérum és a pericardialis folyadék húgysav szintje között igen erős korrelációt mutattunk ki mind a betegcsoportokban külön-külön, mind együttesen. A húgysav egy kis molekula (170 Dalton), ami lehetővé teszi azt, hogy a vérplazmából ultrafiltráció útján a pericardialis folyadékba jusson koncentrációfüggő módon.

Billentyűbetegekben a szérum és a pericardialis folyadék húgysav koncentrációja szignifikánsan magasabb volt, mint koszorúérbetegekben. A betegek anamnézise alapján megállapítható volt, hogy a billentyűbetegek többen szedtek diuretikumokat, mint a coronariabetegek (lásd 1.B. táblázat), és ezen gyógyszerek húgysav emelő hatása jól ismert.

Az emelkedett szérum húgysav koncentráció és a cardiovascularis betegségek kapcsolata jól ismert a szakirodalomban, ennek ellenére vitatott a húgysav szerepe. Koszorúérbetegségben pozitív kapcsolatot találtak az emelkedett szérum húgysavszint és a cardiovascularis morbiditás és mortalitás között (Liese AD és mtsai 1999, Aldermann M. 1999). Krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegekben a keringő gyulladásos markerek és a húgysav koncentráció között szoros korreláció volt (Leyva F és mtsai 1998). Egyes szerzők szerint az emelkedett húgysav szintek mintegy az érlemezésedésre és az oxidatív károsodásra adott kompenzációs gyulladásos válaszlépésnek tekinthetők (Nieto FJ és mtsai 2000).

Mások viszont megállapították, hogy nem növelte az emelkedett húgysav szint a koszorúérbetegség kialakulását vagy a szívbetegségek mortalitását (Culleton BF és mtsai 1999).

A húgysav xantinból keletkezik a purin anyagcsere végtermékeként a xantin dehidrogenáz vagy a xantin oxidáz hatására. Ha a húgysav a xantin-dehidrogenáz hatására keletkezik, akkor nem képződik melléktermékként szuperoxid anion. Alacsony oxigén tenzió, gyulladásos citokinek, hormonok váltják ki a xantin dehidrogenáz xantin oxidázzá alakulását. Ilyenkor szuperoxid gyök is felszabadul, és oxidatív stressz alakulhat ki. A xantin oxidáz gátlók csökkentik a szérumban húgysav szintet. A húgysav endogén gyökfogó és antioxidáns, a szinglet oxigént, a peroxil gyököket és a hidroxil gyököket hatástalanítja és így csökkenti az oxidatív stresszt. (Reyes AJ 2003, 2005).

Egyes gyógyszerek (pl. diuretikumok, alacsony dózisú acetilszalicilsav) növelik a vesén át kiválasztódó húgysav visszaszívódását a vese proximális tubulusában, így a szérumban húgysav szint emelkedéséhez vezetnek, szabadgyök képződés nélkül. Ez esetenként pozitív hatású lehet a húgysav antioxidáns hatása miatt (Reyes AJ 2005).

Egészségesekben a parenterálisan adott húgysav emelte az antioxidáns kapacitást (Waring WS és mtsai 2001). Az, hogy az emelkedett húgysav szint önmagában képes-e emelni az antioxidáns védelmet, további vizsgálatra szorul.

A pericardialis folyadék albumin koncentrációja a Se albumin koncentrációjának 60%-a volt, a PF TAS szintje a szérumban szint 67%-a volt. Ebből következik, hogy feltehetően a PF alacsonyabb TAS szintje a PF alacsonyabb albumin koncentrációjának köszönhető.

A TAS a szervezet antioxidáns védelméről ad átfogó képet, értéke mintegy 50%-ban az antioxidáns hatással rendelkező húgysav és albumin koncentrációjától függ, 40%-ban függ a szérumban alfa-tokoferol, béta-karotin, cisztein, glutation, bilirubin, ubikinon és más fenolsavak szintjéről, 10 %-ban függ a C vitamintól (Miller NJ és mtsai 1997, Staub M 1999).

Egészséges 20-55 évesek vérében a TAS, a húgysav és az albumin koncentrációja szignifikánsan magasabb volt férfiakban, mint nőkben, a SOD és GPOx átlagértékei nem különböztek lényegesen a két nem között. Ez, valamint szoros korrelációjuk a TAS értékekkel minden bizonnyal egyik oka a TAS-ban mutatkozó nemi különbségeknek (Antal M. és mtsai 2004).

Vizsgálatainkban a pericardialis folyadék húgysav, albumin és összfehérje szintek szignifikánsan magasabbak voltak férfi betegekben, mint nőkben. Ismert, hogy a menopauza előtt nagyságrendekkel ritkább a szívbetegség jelentkezése nőkben, míg menopauza után ez a nemi különbség egyre csökken, a védő hatások kiesése miatt.

A hagyományos koszorúér bypass műtét és koszorúér angioplasztika során a női nem független rizikófaktoraként szerepel a műtét körüli komplikációk és a cardiovasculáris mortalitás szempontjából. (Williams MR és mtsai 2000, Abramov D és mtsai 2000, Feldman T és mtsai 2000, Jensen J és mtsai 2000, Hartz R és mtsai 2001, Zaroff JG és mtsai 2002, Hassan A és mtsai 2005, Wenger NK 2002)). Az off pump koszorúérműtétek mellett nem volt különbség a férfiak és nők korai műtéti kimenetelben és a műtét körüli szövődményekben (Bernet F és mtsai 2006).

Menopauzában vagy menopauza után lévő nők vérében szignifikánsan csökkent az antioxidánsok szintje (Krstevska M és mtsai 2001) és a TAS és a GPOx érték a premenopauzás nőkhez képest (Antal M és mtsai 2004). Az oxidatív stressz markerek (malondialdehid és F2-izoprosztán) nagyobb koncentrációját mérték a nők vérében összehasonlítva a férfiakkal egészséges populációban (Block G és mtsai 2002) és hipertóniás betegekben (Ward NC és mtsai 2004). Az 1. típusú diabetesben nőkben csökkent antioxidáns kapacitást és megnövekedett oxidatív stresszt mértek, ami a diabetes szívsvödményeinek kialakulásához járulhat hozzá (Marra G és mtsai 2002).

Az a tény, hogy a teljes antioxidáns kapacitás két független mérőmódszerrel mérve sem különbözött a PF-ban a férfiak és nők között, kivéve férfiakban mért magasabb húgysav és albumin koncentrációt, azt mutatja, hogy a TAS és ImAnOX nem eléggé érzékeny ilyen változások követésére. Az albumin és a húgysav meghatározása más teljes antioxidáns kapacitás mérő módszerrel együtt nagyobb bepillantást enged az EC folyadékok antioxidáns védelmi rendszerébe, mint a teljes AOC mérése önmagában. Véleményünk szerint az önálló antioxidáns komponensek mérése megbízhatóbb, mint a teljes AOC mérése.

A magas PF húgysav és albumin szintek antioxidáns hatása miatt a PF részt vehet a myocardium helyi antioxidáns védelmi rendszerében. A férfi nem ebből a szempontból előnyt jelent. További vizsgálatokat igényel, hogy a nők körében magasabb műtét körüli szövődmények kialakulásában játszhat-e szerepet a PF antioxidáns összetételében meglévő nemi különbség.

5.2 Oxidatív stressz vizsgálata kritikus állapotú betegekben

A kritikus állapot (szívtranszplantáció, elektív aorta aneurizma vagy akut aneurizma ruptura eseteit, alsó végtagi elzáródás műtete utáni ischaemia-reperfusio, sepsis, stroke) miatt intenzív osztályos kezelés alatt álló betegeknél megfigyeltük az oxidatív stressz jelentkezése, a szövődmények kialakulása és az AOPP értékek közötti összefüggést.

Az AOPP megbízható oxidatív stressz markernek bizonyult, amelynek a vizsgálatával nyomon követhető az állapot változás, monitorizálás. A kezelés hatásosságának utánkövetésére is alkalmas lehet, az alapbetegség javulásával az oxidatív stressz csökkenését lehet kimutatni.

Kritikus állapotú betegekben az oxidatív károsodás szintjét és betegség kimenetelét vizsgálva szoros összefüggést találtak az emelkedett MDA szintek és F₂ izoprosztán szintek és a rosszabb prognózis között. Az oxidatív stressz markerek csökkenését figyelték meg a betegség javulásával (Mishra V és mtsai 2005).

A *szívtranszplantációra* kerülő betegekben az alapbetegségtől függően jelentős lehet az oxidatív stressz. A műtét előtti magas AOPP oka a különböző súlyosságú szívelégtelenség. A szövődménymentes esetekben a műtét utáni 4-5 napon az AOPP koncentrációjának csökkenése a referencia értékek szintjére mutatja a beavatkozás hatékonyságát. A szövődménnyel társult esetekben emelkedett AOPP jelzi az oxidatív stressz jelenlétét.

Az *aorta aneurizma* több mint 3%-ban jelentkezik a 65 év feletti korosztályban. Az elváltozás az aortafal helyi károsodásával, majd tágulatával jár. Az elastikus média károsodásában gyulladásos folyamatoknak van szerepe. Az elasztin fehérje emésztődés során lebontódik, mátrix metalloproteinázok, és más proteázok vesznek ebben részt (Shah PK. 1997). A simaizomsejtek az EC mátrix fehérjéket, pl. az elasztint csökkent mértékben termelik. Az apoptotikus folyamat során a simaizomsejtek is pusztulnak, és kialakul az aneurizma. A ROS szerepe kiemelt ebben a folyamatban, a szuperoxid termelése a gyulladásos sejtekben megnő. Szuperoxid gyök keletkezhet az endothel- az érsimaizomsejtekben és a fibroblasztokban is. Aorta aneurizmában az ér médiájában megnő a NAD(P)H enzim expressziója. Az érsimaizomsejtekben növeli a ROS produkciót a hipertensio, az angiotenzin II., amely proapoptotikus hatású is. A ROS aktiválja a mátrix metalloproteinázokat, aminek eredménye az EC mátrix károsodása lesz (Rajagopalan S és mtsai 1996). A ROS apoptózist indukál az ér simaizom

sejtekben, ami az aorta aneurizma kialakulásának fő oka. Aorta aneurizmás betegek vérében csökkent C-vitamin, E-vitamin és antioxidáns szinteket mértek nem aneurizmás koszorúérbetegek vérével összehasonlítva (Dubick MA és mtsai 1999, Sakalihan N és mtsai 1996). Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy nagyobb az oxidatív stressz a már kialakult aneurizmák esetén, mint az atherosclerosis megléte mellett még ki nem alakult esetekben (Miller FJ és mtsai 2002).

Vizsgálatainkban az aorta aneurizma miatt elektív műtétre kerülő betegek műtét előtti emelkedett AOPP értéke a már meglévő oxidatív stresszt jelzi. A műtét utáni napokban jelen lévő magas AOPP szint, illetve további emelkedés jelzi a reperfusios károsodás jelentkezését.

Az aorta aneurizma rupturája miatt súlyos akut vérvesztés állapota alakul ki. A vérellátás romlik a létfontosságú szervekben és főleg a periférián. Az AOPP a detektálási szint alá csökken. Ennek oka valószínűleg az, hogy a műtét utáni napokban közvetlenül a keringés lelassul, kivérzett állapotban csökken a plazma fehérjék szintje, ez a reperfusio ellen hat. Amikor elkezdődik az AOPP emelkedése, a referencia értéktartomány fölé, az a vérvesztéses állapotokban paradox módon az állapot javulásaként értékelhető, vagyis a szövetek, szervek megindult reperfusiojának jeleként.

Stroke: Agyi érelzáródás során az emelkedett AOPP koncentráció a fellépő oxidatív stressz állapotot jelzi. Számos irodalmi adat támasztja alá az oxidatív stressz károsító hatását agyi sérülésben ischaemia-reperfusio után (Madamanchi NR és mtsai 2005, Traystman R és mtsai 1991, Chan P és mtsai 2001). Alacsonyabb C-vitamin és emelkedett homocisztein, lipid peroxid és NO szinteket mértek ischaemias stroke állapotában lévő betegek plazmájában összehasonlítva egészséges egyénnel (El Kossi M, Zakhary MM. 2000). A stroke állapotában lévő betegek vérében a keringő fagociták nagyobb mértékben termeltek ROS-t, mint az egészséges egyének mintáiban (Alexandrova M és mtsai 2001). A fagociták fokozott működésének szerepe lehet az AOPP koncentráció emelkedésében a fokozott HOCl képződés révén.

A *sepsis*ben szenvedő intenzív kezelést igénylő betegekben az AOPP koncentráció emelkedése és az állapot változása között szoros összefüggés van.

Az oxidatív stressz a kritikus állapotú betegekben fontos szerepet játszik a szisztémás gyulladásos folyamatokban (Del Rio D és mtsai 2002). A fertőzések során a neutrofil granulociták és a makrofágok aktivitása megnő. Gyulladás, szepszis során fokozott a

NAD(P)H oxidáz enzim működése, a szuperoxid anion keletkezése (Babior BM. 1984). A mieloperoxidáz enzim ugyancsak hozzájárul a szuperoxid gyök keletkezéséhez (Schraufstatter IU és mtsai 1990). Az AOPP gyulladásos mediátorként hat, fokozza a gyulladásos citokinek produkcióját (neutrofilek, monociták), oxidatív burst-öt indukál. (Witko-Sarsat V és mtsai 1998). Az AOPP keletkezésében a mieloperoxidáz enzimnek fontos szerepe van, a hatására képződött HOCl révén (Capeillere-Blandin C és mtsai 2004). A mieloperoxidáz hatására ditirozin is képződhet, ami az AOPP szintekkel szoros összefüggést mutat (Heinecke JW és mtsai 2003).

Összefoglalásul leírhatjuk, hogy a kritikus állapotú betegekben az ischaemia-reperfúzió, stroke, sepsis, gyulladás, perifériás érbetegség oxidatív stressz kialakulásával járó állapotok, az AOPP emelkedik. A kritikus állapotú, súlyos akut vérvesztés állapotában lévő betegek esetében az AOPP igen alacsony vagy akár a detektálási szint alá csökkenhet a műtét utáni első napokban.

5.3 Oxidatív stressz vizsgálata acut coronaria szindrómában

A szívkatéterezésre kerülő effort anginás, instabil anginás és acut myocardiális infarctusban szenvedő betegekben vizsgáltuk az oxidatív stressz kialakulásának esélyét és a szövődmények kialakulásával való összefüggését, nyomon követve ezalatt az AOPP értékek változását. A plazma átlagos AOPP szintje magasabb volt az irodalomban és a saját referencia anyagban mért értékekhez viszonyítva. Az emelkedés mérsékelt volt, ennek oka lehet, hogy a mintavételünk valószínűleg az oxidatív stressz kialakulásának kezdeti időszakában történt. Az acut myocardiális infarktus (AMI) diagnózissal érkezett betegek a tünetek kezdetétől számítva 0,5-12 óra múlva jutottak kórházba. Azokban a betegekben, akiknek már hosszabb ideje fennálló társbetegségük pl. diabetes mellitus, veseelégtelenség, fertőzés, szepszis volt, kifejezetten emelkedett AOPP értékeket mértünk. A szívelégtelenség szövődménnyel érkezett AMI-ban szenvedő betegek plazmájában szintén magas volt az AOPP koncentráció.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az első vérvételig eltelt idő alatt nem alakul ki oxidatív stressz, a szövődményekkel, vagy társbetegségekkel nem kísért acut coronaria szindrómában. Az AMI miatt direkt PTCA-ra és az angina pectoris miatt elektív PTCA-ra kerülő betegektől vett vizeletmintákban nem találtak szignifikáns különbséget a 8 epi

PGF₂ szintekben a PTCA előtt. AMI-ben a PTCA utáni 60-90. percben emelkedett szignifikánsan a vizeletben mért 8 epi PGF₂. A PTCA után az ischaemia-reperfusio ideje alatt mérhető a szabadgyökök felszabadulásából eredeztethető oxidatív stressz (Guan W és mtsai 1999).

Koronarográfiával igazolt koszorúérbetegekben emelkedett AOPP szinteket mértek. Az AOPP értéke szignifikáns összefüggést mutatott a koronáriák állapotával (Kaneda H és mtsai 2002).

A szövődményekkel (szívelégtelenség, gyulladás) vagy társbetegséggel (diabetes mellitus, veseelégtelenség) kísért acut coronaria szindrómában mért emelkedett AOPP értékek egyértelműen jelzik az oxidatív stresszt. A diabetes mellitus mindkét típusában emelkedett AOPP koncentrációkat mértek, de a 2. típusú DM-ben szenvedő betegek AOPP értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint az 1. típusú DM csoporté (Kalousová M és mtsai 2002).

5.4 Oxidatív stressz vizsgálata perifériás érbetegekben

A carotis szűkülettel és az alsó végtagi elzáródás miatt érműtetre kerülő betegekben magas volt az oxidatív stressz. Az atherosclerosis kialakulásában és fenntartásában az oxidatív stressznek kiemelt jelentősége van.

Az AOPP értékeket nem befolyásolta jelentősen a perifériás érbetegekben hosszabb ideje fennálló társbetegségek (hipertónia, diabetes) megléte. Ennek oka lehet, hogy az alapbetegség, az általános atherosclerosis oxidatív stresszt emelő hatása dominált. Az alsó végtagi elzáródás során a betegeknél a claudicatio intermittens tünete jelentkezik, aminek során ischaemia majd reperfusio alakul ki.

Az atherosclerosisban szenvedő betegek plazmájában magasabb AOPP és AGE értékeket mértek, mint az egészséges kontroll egyénekben. Ez összefüggésben állt a lipid metabolizmus paramétereivel (Kalousova M és mtsai 2005). Krónikus vesebetegekben a magasabb AOPP koncentráció összefüggésben állt az atherosclerosis kialakulásával (Descamps-Latscha B és mtsai 2005). Krónikus vesebetegek plazmájában szignifikánsan magasabb AOPP szinteket mértek azokban, akikben az art. carotis-on plakk volt (Yang XB és mtsai 2005). Az AOPP értéke összefüggést mutatott

a CRP-vel az art. carotis intima-media vastagsággal, az atherosclerosis korai jelzőjével (Drueke T és mtsai 2002).

A carotis atherosclerotikus plakk aktivitása során magasabb high sensitive C-reaktív protein és fibrinogén szinteket mértek a betegek vérében. A carotis endarterectomia után, amikor a plakk és az ér endotheliuma is eltávolításra került, a betegek utánkövetése során mindkét akut fázis protein mennyisége lecsökkent (Dósa E és mtsai 2004). Az atherosclerotikus plakk egy aktív gyulladásos hely, számos anyag termelésére (citokinek, TNF α) képes. A plakk eltávolításával a gyulladásos faktorok csökkentésével ez a hatás csökken, mert a gyulladás ellenes és az antikoaguláns hatások felerősödnek. Az alsó végtagi érbetegekben az alsó végtagon jelentkezett gangréna szignifikáns AOPP emelkedést okozott. A gyulladásos folyamat hozzájárult az AOPP emelkedéséhez.

5.5 Oxidatív stressz vizsgálata állatkísérletes modellben

A szívsebészetben számos szívbetegség műtéti megoldása csak az aorta leztorítása és szívmegállás mellett lehetséges. A kardioplégiás technika fejlődése ellenére a kamrai elégtelen működés még mindig az egyik legfontosabb oka a perioperatív morbiditásnak és mortalitásnak. A cardiopulmonaris bypass során szabadgyökök szabadulnak fel, ischaemia-reperfusios folyamatok során. 60 perces LAD leztorítás és 60 perces reperfüzió után a sinus coronariusban mért MDA szintek és SOD enzim aktivitása nőtt, míg a redukált glutation csökkent (Lantos J és mtsai 2001). A CPB során szisztémás gyulladásos reakciók indulnak el (Gasz B és mtsai 2005). A csökkent nitrogén oxid szintáz (NOS) és a csökkent L-arginin hozzáférhetőség az NO csökkent féléletidejéhez vezet. A fokozott szabadgyök képződés az NO fokozott lebomlásához és peroxinitrit képződéshez vezet, ami a sejttoxicitás elindítójává válik (Szabó Cs.2003).

A poli (ADPriboz) immunhisztokémiai kimutatása során megfigyelték, hogy a PARP a reperfundált szívizomban gyorsan aktiválódott. (Pieper AA és mtsai 2000). A reperfusios károsodást a szívizomzatban a szisztémásan adott PARP gátló PJ34 kivédte. Számos adat ismert a PARP inhibíció ischaemia-reperfusioban a szívizomzatra gyakorolt hatásában. (Zhou HZ és mtsai 2006, Szabo G és mtsai 2004a, b).

5.5.1 Myocardialis károsodás vizsgálata CPB után PARP inhibitor (INO-1001) jelenlétében

Vizsgálatainkban a cardiopulmonaris bypass és a szívmegállás, majd 60 perces reperfusio utáni szív károsodások kivédésének lehetőségeit vizsgáltuk a PARP enzim gátlószerével (INO-1001). A CPB és 60 perces reperfúzió után a hemodinamikai paraméterek a kontroll csoportban megváltoztak, csökkent az artériás középnyomás, a koronáriaáramlás és a bal kamrai kontraktilitást jellemző terhelés független paraméterek: PRSW és E_{es} értékei a kiindulási értékekhez képest, míg a PARP gátlóval (INO-1001) kezelt csoportban ezek a paraméterek szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz képest, megközelítve a kiindulási értékeket.

A v. cava leszorítás során különböző preload mellett lehet P-V görbét felvenni, és más szisztolés funkcióra jellemző paramétereket (pl. PRSW) lehet számolni. A PRSW a szív munka és a bal kamrai végdiasztolés térfogat közötti egyenes összefüggés. Leírták, hogy a PRSW független a kamra méretétől és tömegétől, viszont érzékeny a kamra kontraktilis működésére, a szisztolés funkcióra (Kass DA 1995). A bal kamrai elaszticitás (E_{es}) csökkenése a bal kamra csökkent szisztolés működésére utal.

A hipotermiás szívmegállás és reperfusio a szív kontraktilitás és a coronaria áramlás csökkenését okozta (Szabó G. és mtsai 2003, 2004b). Korábbi vizsgálatok kimutatták a PARP enzim aktivációt a szív reperfusioja során; a csökkent reperfusios károsodást a PARP enzim génkiütött állatokban vagy a PARP enzimgátlók alkalmazása mellett Virag L, Szabo C. 2002, Szabo G és mtsai 2004a, Yeh CH és mtsai 2006).

Az INO-1001 PARP gátló hatásmechanizmusa többféle: az ischaemia-reperfusio számos fajtájában a PARP aktiváció megelőzése a nagy energiájú foszfátok, NAD^+ , ATP raktárak megmaradásához vezet, így a javulnak a sejt energia viszonyai. A PARP aktiváció adhézions molekulák ICAM-1, P-szelektin expresszióját is befolyásolja az ischaemia, reperfusio alatt, és ezzel összefüggésben a neutrofilek beáramlását a károsodott szövetekbe. A sejtek energetikai viszonyainak helyreállítása és a gyulladást elősegítő hatás gátlása egyaránt hozzájárul a PARP gátlás szívvédő hatásához (Virag L, Szabo C 2002, Szabo G és mtsai 2004b).

5.5.2 Mesenterialis károsodás vizsgálata CPB után PARP inhibitor (PJ34) jelenlétében

A cardiopulmonaris bypass és 60. perces reperfúzió után vizsgáltuk a szív- és mesenterialis károsodás kivédésének lehetőségét a PJ-34 PARP inhibitorral. A hemodinamikai paraméterekben az artériás középnyomás, a verőtérfogat és a bal kamra időegység alatti nyomásváltozás maximuma, a dp/dt_{max} (ami a bal kamrai kontraktilitás változásaira érzékeny, de nem független a preload változásaitól) csökkent a kontroll csoportban a reperfusio végén, míg a PJ-34 PARP gátlóval kezelt csoportban megtartott maradt a kiindulási értékhez képest. Az INO-1001 gátló alkalmazásához hasonlóan a PJ34 is kivédte a szisztolés működészavart.

Vizsgálatunkban a cardiopulmonaris bypass és reperfusio után az ACH-ra adott mesenterialis vazodilatáció csökkent. Ennek oka valószínűleg az, hogy a károsodott endothelium NO termelő kapacitása csökkent. A simaizom válaszkészsége megtartott az NO-donor nátrium-nitroprusszid mellett, tehát az ér endothelium károsodának, és nem a simaizom károsodásnak a jele a csökkent vazodilatációs válasz.

A PJ-34 PARP gátlóval kezelt csoportban megtartott volt az endothelium függő vazodilatáció a reperfusio végén. A PARP túlaktiválás gátlása a sejt energia raktárainak (NAD^+ , ATP) megmaradásához vezetett, ami az endothelsejtek integritásának megőrzését segítette elő.

A kontroll csoportban mért csökkent mesenterialis áramlás, a csökkent endothelialis funkció és az anaerob metabolizmusra való átváltás (megnövekedett laktát szint) és a sejt sérülés (emelkedett CK aktivitás) volt jellemző.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban megállapította, hogy a cardiopulmonaris bypass mesenterialis hipoperfúziót, gyulladásos reakciót, szabadgyök felszabadulást okoz, ami a mesenterialis ér működés zavarához, a helyi értágító és érszűkítő anyagok közötti egyensúly megbomlásához vezetett (Andrási TB és mtsai 2002, 2003). Irodalmi adatok a splanchnikus területen az art. mesenterica superior leszorításával és felengedésével létrehozott ischaemia-reperfusio vizsgálata során rágesálókban peroxinitrit felszaporodást és PARP aktivációt detektáltak a reperfusio után (Cuzzocrea S és mtsai 1997, Liaudet L és mtsai 2000). A PARP aktivációt szabadgyökök keletkezése váltotta ki a splanchnikus terület ischaemia-reperfusioja során, amit bizonyítanak azok a vizsgálatok, ahol szabadgyökfogókat, N-acetilciszteint adtak, ami

gátolta a PARP aktivációját a reperfundált bélben. (Cuzzocrea és mtsai 2000a, b). A reperfusio során felszabaduló peroxinitrit és hidroxil gyökök PARP függő endothelium sérülést hoznak létre, ami neutrofil granulociták infiltrációjához vezet az endotheliumban (Tofukuji M és mtsai 2000). A neutrofil granulocitákból további hidroxil és peroxinitrit gyökök szabadulnak fel. Ez egy önrontó visszacsatolós folyamat. Ezek a változások az érműködés szabályozásának zavarához, a véráramlás átrendeződéséhez vezetnek, aminek eredménye a vér elvonása lesz a metabolikusan aktív bél mucosától. A bélben az anyagcsere anaerob irányba tolódik el, és sejtkárosodás alakul ki. A PARP gátlás az endothelium sérülése szintjén megszakítja ezt a negatív visszacsatolós kört (Mazzon E és mtsai 2002).

A PARP inhibitorok, mint pl. 3-aminobenzamid vagy PJ34 alkalmazása vagy a PARP genetikus inaktiválása csökkentette a bél ischaemia-reperfusios károsodását a szövettani és funkcionális vizsgálatok alapján (Liaudet L és mtsai 2000, Jagtap P és mtsai 2002). A PARP gátlás megelőzte a reperfundált bélszövetekbe a neutrofilek infiltrációját, csökkentette a nitrotirozin képződését (Virag L, Szabo C. 2002).

Az immunhisztológiai vizsgálat igazolta a kontroll csoportban a CPB utáni PARP aktivációt a mesenterium bél mucosa sejtjeiben. A helyi hipoperfúzió és a szisztémás gyulladásos reakció közreműködik az oxidatív stressz létrejöttében. A szabadgyökök (peroxinitrit) indukálta DNS egyes szál törés a PARP aktivációját váltja ki.

Splanchnikus érleszorítás és felengedés után a PARP gátlás mellett kisebb volt a mesenterialis véráramlás csökkenése, csökkent a morfológiai károsodás, a neutrofilok infiltrációja, csökkent a P-selectin és ICAM-1 up-regulációja, és csökkent a bél mucosa hiperpermeabilitása (Mazzon E és mtsai 2002, Cuzzocrea S és mtsai 1997). Ezek a megfigyelések hasonlóak voltak a szívizomzat ischaemia-reperfusios károsodásához. A splanchnikus terület érleszorítása és felengedése során megfigyelteket nem lehet egyben alkalmazni a CPB utáni mesenterialis károsodásra, mert az ér a CPB alatt nincs lezórítva. Mégis funkcionális hypoxia lép fel a CPB alatt az áramlás átrendeződése miatt a tápláló kapillárisoktól az arteriovenosus shunt-ök felé (Andrási TB és mtsai 2003). Az áramlás átrendeződést intravital mikroszkópikus vizsgálatok is igazolták (Sack FU és mtsai 2002). A CPB elősegíti a neutrofil granulocita-endothelialis interakciót, a neutrofilek korai kigördülését a P-selectin, a késői kitapadási fázist az ICAM-1 szabályozza.

A CPB kiváltotta mesenterialis károsodás okai a helyi áramlási elégtelenség, a szisztémás gyulladásos reakció, ami a PARP túlaktiválásához vezet. Elindítva ezzel az endothel kóros működés pozitív visszacsatolós önrontó körét, további szabadgyök képződéssel, és szöveti károsodással. Vizsgálatunkban a szisztémás PARP gátlás (PJ 34) mesenterialis érműködés károsodás és szöveti károsodást kivédő hatását igazoltuk. A PARP gátló alkalmazása jelentős előnyt jelenthet a CPB során kialakuló ischaemia-reperfúzió, gyulladásos reakció okozta másodlagos szervkárosodások kivédésében is.

6 Következtetések

- Összehasonlítottuk az emberi pericardialis folyadék antioxidáns kapacitását a szérummal, és megállapítottuk, hogy a pericardialis folyadék antioxidáns kapacitása viszonylag magas (a szérumhoz viszonyítva annak 67,8%-a). Ez döntően az albuminnak és a húgysavnak tulajdonítható. A koszorúérbetegség és a billentyűbetegség miatt szívműtétre került betegek mintáiban mért antioxidáns kapacitás tekintetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között, sem a szérumban, sem pedig a pericardialis folyadéokban.

Férfiakban és nőkben mért pericardialis folyadék húgysav és albumin koncentrációk között szignifikáns különbség van. A nők magasabb perioperatív morbiditásában a pericardialis folyadék csökkent antioxidáns kapacitása kockázati tényező lehet.

Véleményünk szerint a pericardialis folyadék szerepet játszhat a myocardium antioxidáns védelmében.

- Kritikus állapotban lévő betegekben (ischaemia-reperfusio, sepsis, stroke, pneumonia) az AOPP megbízható oxidatív stressz markernek bizonyult, amelynek a vizsgálatával nyomon követhető az állapot változás (monitorizálás). A kezelés hatásosságának utánkövetésére is alkalmas lehet, az alapbetegség javulásával az oxidatív stressz csökkenését lehet kimutatni.
- Acut coronaria szindrómában a korai akut szakban nem jellemző az oxidatív stressz, hacsak nincs jelen valamilyen kísérőbetegség (pl. diabetes mellitus, krónikus veseelégtelenség) vagy valamilyen szövődmény (pl. szívelégtelenség).
- Műtétre kerülő perifériás érbetegekben következetesen emelkedett plazma AOPP koncentrációkat mértünk. Ez a jelenség valószínűleg az atherosclerosis progressziójával kapcsolatos. Súlyosbító szövődmények lehetnek a társuló gyulladás, alsó végtagon kialakuló gangréna.
- Állatkísérletben a cardiopulmonalis bypass okozta oxidatív stressz, myocardialis károsodás és másodlagos szervkárosodások (bél, mesenterialis károsodás) kialakulásában a PARP enzim aktiválódásának jelentős szerepe van. A PARP enzim gátló (PJ34 vagy INO-1001) alkalmazása javította a szívfunkciót, az a. mesenterica véráramlást, az ér válaszkészségét és csökkentette a bélkárosodást.

MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

Oxidatív stressz szív- és érrendszeri betegségekben és állatkísérletes modellekben

Szerző: Dr. Seres Leila Bettina

Készítés helye: Budapest, Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Program: Az ischaemiás keringési betegségek élettana és klinikuma

Programvezető: Dr. Juhász-Nagy Sándor M.D., Ph.D., D.Sc.

Témavezető: Dr. Horkay Ferenc M.D., Ph.D., D. Sc.

A cardiovascularis megbetegedések hátterében álló atherosclerosis, hypertensio és a rizikófaktorok (diabetes, elhízás, dohányzás) okozta kórfolyamatokban szerepe van az oxidatív stressznek, ami a reaktív oxigén vagy nitrogén eredetű szabadgyökök keletkezése és az antioxidáns védő rendszerek közötti egyensúly megbomlása miatt alakul ki.

1. Dolgozatomban humán vizsgálatokban teljes antioxidáns kapacitást határoztunk meg ischaemiás (koszorúérbetegség) és nem ischaemiás szívbetegség (billentyűbetegség) miatt szívműtétre kerülő betegekben a szérumban és a pericardialis folyadékában. A humán pericardialis folyadék antioxidáns kapacitása viszonylag magas, szerepet játszhat a myocardium antioxidáns védelmében. A két betegcsoport között nem volt szignifikáns különbség. Nemi különbségeket találtunk: a pericardialis folyadék antioxidáns kapacitása nőkben alacsonyabb a húgysav és albumin csökkent koncentrációja miatt. 2. Egy, a munkacsoportunk által leírt, automatizált mérési módszerrel, a fehérjék oxidációján alapuló, oxidatív stressz biomarker (advanced oxidation protein products, AOPP) referencia értéktartományát vettük fel egészséges önkéntesektől származó plazma mintákban. Különböző cardiovascularis megbetegedésekben AOPP meghatározásokat végeztünk, összefüggést kerestünk a társbetegségek, a szövődmenyes esetek és az oxidatív stressz súlyossága között. Kritikus állapotban lévő betegekben (ischaemia-reperfusio, sepsis, stroke, pneumonia) az AOPP vizsgálatával nyomon követhető az állapot változása. Acut coronaria szindrómában a korai akut szakban nem jellemző az oxidatív stressz, hacsak nincs jelen valamilyen kísérőbetegség (pl. diabetes mellitus, krónikus veseelégtelenség) vagy valamilyen szövődmeny (pl. szívelégtelenség). Műtétre kerülő perifériás érbetegekben következetesen emelkedett plazma AOPP koncentrációkat mértünk, ami valószínűleg az atherosclerosis progressziójával kapcsolatos. Súlyosbító szövődmenyek a társuló gyulladás és az alsó végtagon kialakuló gangréna. 3. Állatkísérletekben cardiopulmonalis bypass során kutya modellben a poly (ADP)ribóz polimeráz enzim gátlószereinek (PJ34 és INO-1001) hatását tanulmányoztam, amelyek a szabadgyökök okozta sejtkárosodást a PARP enzim gátlásával védik ki. Hatásukra csökkent a szív ischaemia-reperfusios és a másodlagos gyulladásos szervkárosodás (mesenterialis terület, bél mucosa) kialakulásának esélye.

ABSTRACT

Oxidative stress in cardiovascular disease and in experimental models

Author: Leila Bettina Seres M.D.

School of Ph.D. Studies of Semmelweis University of Medicine

Program: Physiology and clinics of cardiovascular diseases

Program leader: Alexander Juhász-Nagy M.D., Ph.D., D.Sc.

Tutor: Ferenc Horkay M.D., Ph.D., D.Sc.

The majority of cardiovascular diseases (CVD) results from complications of atherosclerosis and hypertension. Oxidative stress is the unifying mechanism for many CVD risk factors (diabetes, obesity, cigarette smoking), that additionally supports its central role in CVD. Oxidative stress is the imbalance between antioxidants and overproduction of reactive oxygen or nitrogen species. 1. We assessed the antioxidant capacity in the serum and pericardial fluid of patients undergoing heart surgery for coronary artery disease or valvular heart disease. The antioxidant capacity in the pericardial fluid was lower than in the serum but still relatively high. The pericardial fluid may contribute to the local antioxidant defense of the myocardium. No major differences were seen in serum or pericardial fluid antioxidant capacity between the two patient groups. In the overall patient population uric acid and albumin were significantly lower in the pericardial fluid of female than of male patients. 2. An oxidative stress biomarker, referred to as advanced oxidation protein products (AOPP) reference values were measured in plasma samples from healthy volunteers. We describe in detail an automated version of the originally published microplate-based technique. We measured AOPP concentrations in many cardiovascular diseases for assessing and monitoring oxidative stress. Our experiences appear to demonstrate that this technique is especially suitable for monitoring oxidative stress in critically ill patients (sepsis, reperfusion injury, heart failure). In the acute phase of acute coronary syndrome oxidative stress is not apparent, except in patients with diabetes mellitus, chronic renal disease or cardiac decompensation. Plasma AOPP concentrations were high – presumably due to progressed atherosclerosis – in patients undergoing surgery for various peripheral diseases. Complications such as inflammation or gangrene further enhanced AOPP concentrations. 3. We investigated the effects of poly (ADP)ribose polymerase enzyme inhibitors (PJ34 and INO-1001) in experimental canine model of cardiopulmonary bypass. PARP inhibition prevented cardiopulmonary bypass-induced heart and tissue damage and mesenteric endothelial dysfunction.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abramov D, Tamariz MG, Sever JY, Christakis GT, Bhatnagar G, Heenan AL, et al, (2000) The influence of gender on the outcome of coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg* 70:800–5.
- Abudu N, Miller JJ, Levinson SS. (2006) Fibrinogen is a co-antioxidant that supplements the vitamin E analog trolox in a model system. *Free Radic Res*, 40:321-331.
- Alderman M. (1999) Uric acid in hypertension and cardiovascular disease. *Can J Cardiol*, 15:20F–22F.
- Alexandrova M, Bochev PG, Markova VI, Bechev BG, Popova MA, Danovska MP, Simeonova VK. (2001) Changes in phagocyte activity in patients with ischaemic stroke. *Luminescence*, 16:357–365.
- Allanore Y, Borderie D, Lemarechal H, Ekindjian OG, Kahan A. (2004) Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis *Am J Med*, 116: 595-600.
- Amacher DE. (2006) Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. *Curr Drug Metab*, 3:219-229. Review
- Andrasi TB, Blazovics A, Szabo G, Vahl CF, Hagl S. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34 reduces mesenteric vascular injury induced by experimental cardiopulmonary bypass with cardiac arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288:H2972-8.
- Andrasi TB, Soos P, Bakos G, Stumpf N, Blazovics A, Hagl S, Szabo G. (2003) L-arginine protects the mesenteric vascular circulation against cardiopulmonary bypass-induced vascular dysfunction. *Surgery*, 134:72-9.
- Andrasi TB, Buhmann V, Soos P, Juhasz-Nagy A, Szabo G. (2002) Mesenteric complications after hypothermic cardiopulmonary bypass with cardiac arrest: underlying mechanisms. *Artif Organs*, 26 :943-6.
- Antal M, Nagy K, Bíró L, Regöly-Mérei A. (2004) A fővárosi lakosság antioxidáns státuszát jellemző néhány paraméter a vérben. *Klin Kísérl Lab Med*, 31: 110-116.
- Arthur JR. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 57(13-14):1825-35.
- Babior BM. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 64(5):959-66. Review.

- Avissar N, Whitin JC, Allen PZ, Wagner DD, Liegey P, Cohen HJ. (1989) Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *J Biol Chem*. 264(27):15850-5.
- Becker L B. (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion pathology *Cardiovasc Res*, 61: 461-470.
- Bernet F, Baykut D, Reineke D, Matt P, Zerkowski HR. (2006) Impact of female gender on the early outcome in off-pump coronary artery bypass surgery. *Eur J Med Res*. 2006 Mar 27;11(3):114-8.
- Berry CE, Hare JM. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease - molecular mechanisms and pathophysiologic implications. *J Physiol*, 555:589–606.
- Blazovics A, Kovacs A, Lugasi A, Hagymasi K, Biro L, Feher J. (1999) Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. *Clin Chem*, 45:895-6.
- Block G, Dietrich M, Norkus E P, Morrow J D, Hudes M, Caan B, Packer L. (2002) Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations *Am J Epidemiol*, 156: 274-285.
- Brasen JH, Hakkinen T, Malle E, Beisiegel U, Yla-Herttuala S. (2003) Patterns of oxidized epitopes, but not NF-kappa B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis* 166:13-21.
- Bruynzeel AM, Mul PP, Berkhof J, Bast A, Niessen HW, van der Vijgh WJ. (2006) The influence of the time interval between monoHER and doxorubicin administration on the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58(5):699-702.
- Bulger EM, Helton WS. (1998) Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterol Clin North Am*, 27(2):403-19. Review.
- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R. (2000) Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res*, 47: 221-224.
- Burkle A. (2005) Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J*, 272:4576-89.
- Busse R, Fleming I. (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*, 33: 181-4.

Capeillere-Blandin C, Gausson V, Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. (2004) Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta* 1689: 91-102.

Chan P. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21:2–14.

Chatelain E, Boscoboinik DO, Bartoli GM, Kagan VE, Gey FK, Packer L, Azzi A. (1993) Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta*, 1176(1-2):83-9.

Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3):481-93. Review

Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. (1999) Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*, 131:7–13.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. (2000a) Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 47:537-48.

Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Filipe HM, Costantino G, Caputi AP, Thiernemann C. (2000b) Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock*, 14:150-6.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Szabo A, Salzman AL, Caputi AP, Szabo C. (1997) Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Br J Pharmacol*, 121:1065-74.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52: 601–623.

Dean RT, Shanlin FU, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation *Biochem. J*, 324: 1-18.

DE Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. (1999) Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and humans *Free Radic Biol Med*, 26: 202-226.

- Del Rio D, Serafini M, Pellegrini N. (2002) Selected methodologies to assess oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 12:343-51.
- Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, London GM, Jungers P. (2005) Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 45: 39-47.
- Dosa E, Rugonfalvi-Kiss S, Prohaszka Z, Szabo A, Karadi I, Selmei L, Romics L, Fust G, Acsady G, Entz L. (2004) Marked decrease in the levels of two inflammatory markers, hs-C-reactive protein and fibrinogen in patients with severe carotid atherosclerosis after eversion carotid endarterectomy. *Inflamm Res*, 53:631-5.
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82:47–95. Review
- Drueke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, Gausson V, London GM. (2002) Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation*, 106: 2212-2217.
- Dubick MA, Keen CL, DiSilvestro RA, Eskelson CD, Ireton J, Hunter GC. (1999) Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurysmal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220:39–45.
- El Kossi M, Zakhary MM. (2000) Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke*, 31:1889 –1892.
- Fazekas L, Horkay F, Kekesi V, Huszar E, Barat E, Fazekas R, Szabo T, Juhasz-Nagy A. (1999) Enhanced accumulation of pericardial fluid adenosine and inosine in patients with coronary artery disease. 65: 1005-12.
- Feldman T, Silver R. (2000) Gender differences and the outcome of interventions for acute coronary syndromes. *Cardiol Rev* 8:240–7.
- Ferrari R, Guardigli G, Mele D, Percoco GF, Ceconi C, Curello S. (2004) Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des*, 10:1699–1711.
- Fialova L, Kalousova M, Soukupova J, Malbohan I, Madar J, Frisova V, Stipek S, Zima T. (2004) Markers of inflammation in preeclampsia. *Prague Med Rep*, 105:301-310

Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, Lei XG. (1999) Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 27:605-11. Absztrakt

Fujita M, Ikemoto M, Kishishita M, Otani H, Nohara R, Tanaka T, Tamaki S, Yamazato A, Sasayama S. (1996) Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation*, 94:610–3.

Fujita M, Komeda M, Hasegawa K, Kihara Y, Nohara R, Sasayama S (2001) Pericardial fluid as a new material for clinical heart research. *Int J Cardiol*, 77:113–8.

Gasz B, Lenard L, Benko L, Borsiczky B, Szanto Z, Lantos J, Szabados S, Alotti N, Papp L, Roth E. (2005) Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur Surg Res*, 37(5):281-9.

Griendling KKP, FitzGerald GAM. (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: part i: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*, 108: 1912-1916.

Grone HJ, Grone EF, Malle E. (2002) Immunohistochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis. *Lab Invest*, 82:5-14. Abstract

Guan W, Osanai T, Kamada T, Ishizaka H, Hanada H, Okumura K. (1999) Time course of free radical production after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction and the effect of vitamin C. *Jpn Circ J*, 63(12):924-8.

Gutteridge JMC. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41:1819-28. Review.

Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, Zorkani MA. (2006) Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*, 4(3):215-27. Review.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1986) Oxygen free radicals in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246: 501-514.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, 1989, 543.

Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 142: 231-55. Review

- Hare JM. (2001) Oxidative Stress and Apoptosis in Heart Failure Progression *Circ Res*, 89:198-200.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 91:7A–11A.
- Hartz RS, Rao AV, Plomondon ME, Grover FL, Shroyer AL (2001) Effects of race with or without gender, on operative mortality after coronary artery bypass grafting: a study using The Society of Thoracic Surgeons National Database. *Ann Thorac Surg*, 71:512–20.
- Hassan A, Chiasson M, Buth K, Hirsch G. (2005) Women have worse long-term outcomes after coronary artery bypass grafting than men. *Can J Cardiol*, 21:757-62.
- Heinecke JW, Li W, Daehnke HL, Goldstein JA. 1993. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J. Biol. Chem.* 268:4069.
- Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. (2002) The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*, 62:1524-38.
- Horkay F, Szokodi I, Selmei L, Merkely B, Kékesi V, Vecsey T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. (1997) Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid. *Life Sci*, 62: 267-274.
- Hughes K, Lee BL, Feng X, Lee J, Ong CN. (2002) Coenzyme Q10 and differences in coronary heart disease risk in Asian Indians and Chinese. *Free Radic Biol Med*, 32:132–
- Jagtap P, Soriano FG, Virag L, Liaudet L, Mabley J, Szabo E, Hasko G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F Jr, Sumegi B, Hoyt DG, Baloglu E, VanDuzer J, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C. (2002) Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. *Crit Care Med*, 30:1071-82.
- Jensen J, Eriksson SV, Lindvall B, Lundin P, Sylven C. (2000) Women react with more myocardial ischemia and angina pectoris during elective percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis*, 11:527–35.
- Kalousová M, Skrha J, Zima T. (2002) Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res*, 51: 597-604.

- Kalousova M, Zak A, Soukupova J, Stipek S, Malbohan IM, Zima T. (2005) Advanced glycation and oxidation products in patients with atherosclerosis. *Cas Lek Cesk*, 144:385-9. Abstract
- Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Fujiwara T, Hanada H, Fukui K, Fukuda I, Osanai T, Okumura K. (2006) Increased pericardial fluid level of matrix metalloproteinase-9 activity in patients with acute myocardial infarction: possible role in the development of cardiac rupture. *Circ J*, 70:673-678.
- Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Hanada H, Ishizaka H, Ono H, Saitoh M, Fukui K, Fukuda I, Osanai T, Okumura K. (2003) Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J*, 24:2180-5.
- Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. (2002) Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease *Atherosclerosis*, 162: 221-225.
- Kass DA. Clinical ventricular pathophysiology. A pressure –volume view. In: *Ventricular Function*, edited by Warltier DC. Baltimore, MD: Williams& Williams, 1995, p.131-151.
- Kehrer JP. (2000) The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149:43–50.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. (2001) Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*, 54:356–61.
- Krijgsman B, Papadakis JA, Ganotakis ES, Mikhailidis DP, Hamilton G. (2002) The effect of peripheral vascular disease on the serum levels of natural antioxidants: bilirubin and albumin. *Int Angiol*, 21:44–52.
- Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Bosilkova G (2001) Menopause, coronary artery disease and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 39:641–4.
- Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. (2000) Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*, 101:2264–70.
- Lantos J, Temes G, Gobolos L, Jaberansari MT, Roth E. (2001) Is peripheral blood a reliable indicator of acute oxidative stress following heart ischemia and reperfusion? *Med Sci Monit*, 7(6):1166-70.

- Lantos J, Roth E, Czopf L, Nemes J, Gal I. (1997) Monitoring of plasma total antioxidant status in different diseases. *Acta Chir Hung*, 36(1-4):188-9.
- Levin GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keanley JJ, Vita JA. (1996) Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 93: 1107-1113.
- Leyva F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, (1998) Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation *Eur Heart J* 19:1814–22.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase *Nat Genet*, 11:376–381.
- Liaudet L, Szabo E, Timashpolsky L, Virag L, Cziraki A, Szabo C. (2001) Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. *Br J Pharmacol*, 133:1424-30.
- Liaudet L, Szabo A, Soriano FG, Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. (2000) Poly (ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia. *Shock*, 14:134-41.
- Liese AD, Hense HW, Lowel H, Doring A, Tietze M, Keil U. (1999) Association of serum uric acid with all-cause and cardiovascular disease mortality and incident myocardial infarction in the MONICA Augsburg cohort, World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases. *Epidemiology*, 10:391–7.
- Linton S, Davies MJ, Dean RT. (2001) Protein oxidation and ageing *Exp Gerontol*, 36:1503–18. Review
- Macdonald J, Galley HF, Webster NR. (2003) Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth*, 90(2):221-32.
- Madamanchi NR., Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative Stress and Vascular Disease *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:29-38.
- Mangi AA, Torchiana DF. Pericardial Disease. In: Cohn LH, Edmunds LH Jr, eds. *Cardiac Surgery in the Adult*. New York, McGraw-Hill, 1993: 1359-1372.

- Mallat Z, Philip I, Lebrete M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. (1998) Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2a in pericardial fluid of patients with heart failure. *Circulation*, 97:1536–9.
- Marczin N, Bundy RE, Hoare GS, Yacoup M. (2003) Redox regulation following cardiac ischemia and reperfusion. *Coron Art Dis*, 14: 123-133. (review)
- Marra G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, Di Leo MA, Ruotolo V, et al, (2002) Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defense in patients with uncomplicated type 1 diabetes: a case for gender difference. *Diabetes Care*, 25:370–5.
- Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Domingues C. (2003) Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications *Free Rad Biol Med*, 34: 1563-1574.
- Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. (2001) Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol*, 38: 187-189.
- Mayer M. (2000) Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem*, 46:1723–7.
- Mazzon E, Dugo L, De SA, Li JH, Caputi AP, Zhang J, Cuzzocrea S. (2002) Beneficial effects of GPI 6150, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion *Shock*, 17:222-7.
- McCord JM, Fridovich I (1998). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med*, 5(5-6):363-9.
- Miller FJ Jr, Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. (2002) Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(4):560-5.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V and Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407-412.
- Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A. (2005) Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem*, 42(Pt 4):269-76.

Moreira PI, Honda K, Liu Q, Santos MS, Oliveira CR, Aliev G, Nunomura A, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2005) Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology. *Curr Alzheimer Res*, 2(4):403-8.

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclo oxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:9383-7.

Morrow JD (2005) Quantification of Isoprostanes as Indices of Oxidant Stress and the Risk of Atherosclerosis in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25:1-8.

Nagy A, Toma I, Rusvai M, Barat E, Huszar E, Juhasz-Nagy A, Kekesi V. (2004) Intrapericardial adenine nucleosides induce elevation of endothelin-1 concentration in the pericardial space of the dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44:S227-S230.

Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. (2000) Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 148:131–9.

Nojiri S, Daida H, Mokuno H, Iwama Y, Mae K, Ushio F, Ueki T. (2001) Association of serum antioxidant capacity with coronary artery disease in middle-aged men. *Jpn Heart J*, 42:677-90. Abstract

Pennathur S, Heinecke JW. (2004) Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci*, 9:565–574.

Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 52(2):201-43.

Pieper AA, Walles T, Wei G, Clements EE, Verma A, Snyder SH, Zweier JL. (2000) Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption. *Mol Med*, 6:271-82.

Polidori MC, Savino K, Alunni G, Freddio M, Senin U, Sies H, Stahl W, Mecocci P. (2002) Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radic Biol Med*, 32:148–52.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. (1997) A model for p53-induced apoptosis *Nature*, 389:300–305.

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J Clin Invest*, 98:2572–2579.

Reyes AJ. (2003) Cardiovascular Drugs and Serum Uric Acid. *Cardiovasc Drugs and Ther*, 17: 397–414.

Reyes AJ. (2005) The increase in serum uric acid concentration caused by diuretics might be beneficial in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 7:461-7. Review.

Roebuck KA. (1999) Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Int J Mol Med*, 4:223-30

Sack FU, Dollner R, Reidenbach B, Schledt A, Taylor S, Gebhard MM, Hagl S. (2002) Extracorporeal circulation induced microvascular perfusion injury of the small bowel. *Eur Surg Res*, 34:418-24.

Sakalihasan N, Pincemail J, Defraigne JO, Nusgens B, Lapiere C, Limet R. (1996) Decrease of plasma vitamin E (α -tocopherol) levels in patients with abdominal aortic aneurysm. *Ann N Y Acad Sci*, 800:278–282.

Sakamoto H, Corcoran TB, Laffey JG, Shorten GD. (2002) Isoprostanes-markers of ischaemia reperfusion injury *Eur J Anaesth*, 19:550-559.

Salska A, Gasowski J, Stepniewski M, Grodziczki T. (2005) Antioxidative protection in hypertensive patients treated with diuretics. *AJH*, 18:1130-1132.

Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG. (1990) Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest*, 85:554 –562.

Selmeci L, Antal M, Horkay F, Merkely B, Szokodi I, Bíró L, Székely M, Jobbágy J, Szépvölgyi J, Tóth M. (2000) Enhanced accumulation of pericardial fluid ferritin in patients with coronary artery disease. *Coron Art Dis*, 11: 53-56.

Shah PK. (1997) Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation*, 96:2115–2117.

Siciliano G, Pasquali L, Rocchi A, Falorni M, Galluzzi F, Rocco A, Malvaldi G, Pompella A, Paolicchi A. (2005) Advanced oxidation protein products in serum of patients with myotonic disease type I: association with serum gamma-glutamyltransferase and disease severity. *Clin Chem Lab Med*, 43:745-7.

Soloviev AI, Tishkin SM, Parshikov AV, Ivanova IV, Goncharov EV, Gurney AM. (2003) Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol*, 138(5):837-44.

Soós P, Juhász-Nagy A, Ruskoaho H, Hartyánszky I, Merkely B, Tóth M, Horkay F. (2002) Locally different role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the pericardial fluid. *Life. Sci.* 71: 2563-2573.

Souza HP, Cardounel AJ, Zweier JL (2003) Mechanism of free radical production in the vascular wall *Coron Art Dis*, 14:101-107.

Staub M. (1999) A húgysav jelentősége az antioxidáns védelemben *Orvosi Hetilap*, 140:275-9.

Stohs SJ. (1995) The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 6(3-4):205-28.

Szabo Cs. (2003) Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 11:105-12. Review.

Szabo Cs. (2005) Cardioprotective effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition *Pharmacol Res*, 52:34-43. Review

Szabo G, Liaudet L, Hagl S, Szabo C. (2004a) Poly(ADP-ribose) polymerase activation in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*, 61:471-80.

Szabo G, Soos P, Bahrle S, Zsengeller Z, Flechtenmacher C, Hagl S, Szabo C. (2004b) Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of cardiopulmonary dysfunction in a canine model of cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25:825-32.

Szabo G, Buhmann V, Andrasi T, Stumpf N, Bahrle S, Kekesi V, Hagl S, Szabo C, Juhász-Nagy A. (2003) Poly-ADP-ribose polymerase inhibition protects against myocardial and endothelial reperfusion injury after hypothermic cardiac arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126:651-8.

Szokodi I, Horkay F, Merkely B, Solti F, Geller L, Kiss P, Selmeci L, Kekesi V, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. (1998) Intrapericardial infusion of endothelin-1 induces ventricular arrhythmias in dogs. *Cardiovasc Res*, 38(2):356-64.

Tambara K, Fujita M, Nagaya N, Miyamoto S, Iwakura A, Doi K, Sakaguchi G, Nishimura K, Kangawa K, Komeda M. (2002) Increased pericardial fluid

concentrations of the mature form of adrenomedullin in patients with cardiac remodelling. *Heart*, 87: 242-6.

Taniyama Y, Griendling KKP. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42:1075–1081.

Traystman R, Kirsch JR, Koehler RC. (1991) Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*, 71:1185–1195.

Tofukuji M, Stahl GL, Metais C, Tomita M, Agah A, Bianchi C, Fink MP, Sellke FW. (2000) Mesenteric dysfunction after cardiopulmonary bypass: role of complement C5a. *Ann Thorac Surg*, 69:799-807.

Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. (2003) Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress, *Arch Biochem Biophys*, 420:255–261.

Virag L, Szabo C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54 :375-429:

Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. (1999) Signaling Pathways in Reactive Oxygen Species–Induced Cardiomyocyte Apoptosis *Circulation* 99:2934-2941.

Ward NC, Hodgson JM, Puddey IB, Mori TA, Beilin LJ, Croft KD (2004) Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radic Biol Med*, 36:226–32.

Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. (2001) Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38:365–71.

Wenger NK. (2002) Clinical characteristics of coronary heart disease in women: emphasis on gender differences. *Cardiovasc Res* 53:558–67.

Williams MR, Choudri AF, Morales DL, Helman DN, Oz MC. (2000) Gender differences in patients undergoing artery bypass surgery, from a mandatory statewide database. *J Gend Specif Med*, 3:41–8.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Deschamps-Latscha B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uraemia. *Kidney Int*, 49: 1304-1313.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AH, Canterloup S, Drayer JM, Jungers P, Drueke T, Deschamps-Latscha B. (1998)

Advanced oxidation protein products as a novel mediator of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*, 161: 2524-2532.

Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drueke T, Santangelo F, Descamps-Latscha B. (2003) AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int*, 64:82-91.

Yang XB, Hou FF, Wu Q, Zhou H, Liu ZR, Yang Y, Zhang X. (2005) Increased levels of advanced oxidation protein products are associated with atherosclerosis in chronic kidney disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 44:342-6. Absztrakt

Yeh CH, Chen TP, Lee CH, Wu YC, Lin YM, Jing Lin P. (2006) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase reduces cardiomyocytic apoptosis after global cardiac arrest under cardiopulmonary bypass. *Shock*, 25:168-75.

Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*, 38:1395-9.

Zaroff JG, di Tommaso DG, Barron HV. (2002) A risk model derived from the National Registry of Myocardial infarction 2 database for predicting mortality after coronary artery bypass grafting during acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 90:1–4.

Zhou HZ, Swanson RA, Simonis U, Ma X, Cecchini G, Gray MO. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation and impairment of mitochondrial respiratory chain Complex I function in reperfused mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006 Mar 31.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1404 –1407.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Seres L, Soos P, Szekely M, Horkay F, Selmecci L. Antioxidant capacity of the human pericardial fluid: does gender have a role? Clin Chem Lab Med. 2004;42(8):952-7.
IF (2004): 1,685

2. Szabo G*, Seres L*, Soos P, Flechtenmacher C, Zsengeller Z, Sack FU, Szabo C, Hagl S. Poly-ADP-ribose polymerase inhibition reduces mesenteric injury after cardiopulmonary bypass. Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 52(6):338-43.
*megosztott első szerzők
IF (2004): 0,753

3. Selmecci L, Seres L, Antal M, Lukacs J, Regoly-Merei A, Acsady G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. Clin Chem Lab Med. 2005;43(3):294-7.
IF (2005): 1,918

4. Selmecci L, Székely M, Soós P, Seres L, Klinga N, Geiger A, Acsady G: Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlate with fibrinogen levels
Free Rad Research 2006; 40 (9): 952-958.
IF (2005): 2,323

5. Szabo G, Soos P, Mandra S, Heger U, Flechtenmacher C, Seres L, Zsengeller Z, Sack FU, Szabo C, Hagl S. Mesenteric injury after cardiopulmonary bypass: role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase. Crit Care Med. 2004;32(12):2392-7.
IF (2004): 4,182

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

Beller CJ, Radovits T, Seres L, Kosse J, Krempien R, Gross ML, Penzel R, Berger I, Huber PE, Hagl S, Szabo C, Szabo G. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reverses vascular dysfunction after gamma-irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 65(5):1528-35.
IF (2005): 4,556

Posa I, Horkay F, Seres L, Skoumal R, Kovats T, Balogh E, de Chatel R, Toth M, Kocsis E. Effects of Experimental Diabetes on Endothelin-induced Ventricular Arrhythmias in Dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:S380-S382.
IF (2004): 1,576

Skoumal R, Seres L, Soos P, Balogh E, Kovats T, Rysa J, Ruskoaho H, Toth M, Horkay F. Endothelin Levels in Experimental Diabetes Combined with Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:S195-S197.
IF (2004): 1,576

Ala-Kopsala M, Ruskoaho H, Leppaluoto J, Seres L, Skoumal R, Toth M, Horkay F, Vuolteenaho O. Single assay for amino-terminal fragments of cardiac A- and B-type natriuretic peptides. *Clin Chem*. 2005 Apr;51(4):708-18.
IF (2004): 6,501

Szabo G, Soos P, Mander S, Heger U, Flechtenmacher C, Bahrle S, Seres L, Cziraki A, Gries A, Zsengeller Z, Vahl CF, Hagl S, Szabo C. INO-1001 a novel poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor improves cardiac and pulmonary function after crystalloid cardioplegia and extracorporeal circulation. *Shock*. 2004 May;21(5):426-32.
IF (2004): 3,122

Foldes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mayranpaa M, Sarman B, Seres L, Skoumal R, Lako-Futo Z, deChatel R, Ruskoaho H, Toth M. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 29;308(3):480-5.
IF (2003): 2,836

Kiss O, Geller L, Merkely B, Szabo T, Raschack M, Seres L, Zima E, Juhasz-Nagy A, Horkay F. Endothelin-A-receptor antagonist LU 135.252 inhibits the formation of ventricular arrhythmias caused by intrapericardial infusion of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000 Nov;36(5 Suppl 1):S317-9.
IF (2000): 2,396

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Horkay Ferencnek, aki munkám és a dolgozat elkészítése közben is hasznos tanácsokkal látott el és lehetővé tette számomra a külföldön történő kísérletes munka lehetőségét is.

Köszönöm Dr. Juhász-Nagy Sándor professzor úrnak, hogy kísérletes munkámat a Semmelweis Egyetem Ér- és Szívsebészeti Klinika Kísérleti Kutató Laboratóriumában kezdhettem el, Ph.D. kurzusán részt vehettem és munkámat hallgató koromtól támogatta.

Hálás köszönetem szeretnék kifejezni az Ér- és Szívsebészeti Klinika Központi Laboratóriuma vezetőjének, Prof. Dr. Selmeczi Lászlónak, hogy bekapcsolódhattam az általa vezetett kutatómunkába és elméleti és gyakorlati tanácsaival támogatott mind a kutatómunka, mind a dolgozatírás során.

Köszönet illeti a Semmelweis Egyetem Ér-és Szívsebészeti Klinika Központi Laboratóriuma munkatársait a biokémiai mérések során nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Merkely Bélának és Dr. Fülöp Gábornak az Ér-és Szívsebészeti Klinika Cardiovascularis Centrumban történt mintagyűjtésben nyújtott segítségüket.

Őszintén köszönöm Dr. Kékesi Violetának, Prof. Dr. Tóth Miklósnak a dolgozatom elkészítéséhez nyújtott hasznos tanácsait.

Köszönöm a Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézet Szívsebészeti Osztálya orvosainak, a műtő személyzetnek, hogy a mintagyűjtés során segítségemre voltak.

Köszönet illeti Dr. Szabó Gábort, akivel Németországban a Heidelbergi Egyetem Szívsebészeti Kutató Laboratóriumának vezetőjeként együtt dolgozhattam, aki lehetővé tette számomra az általa vezetett experimentális munkába való bekapcsolódást és szakmai tanácsaiért hálás vagyok. Köszönöm Dr. Soós Pálnak, Dr. András B. Teréziának a németországi közös laboratóriumi munka során kicserélt tapasztalatokat. Itt szeretném megköszönni a Labor Herzchirurgie minden kedves munkatársának számomra nélkülözhetetlen segítségét.

Hálás köszönettel tartozom családomnak szeretetteli támogatásukért.